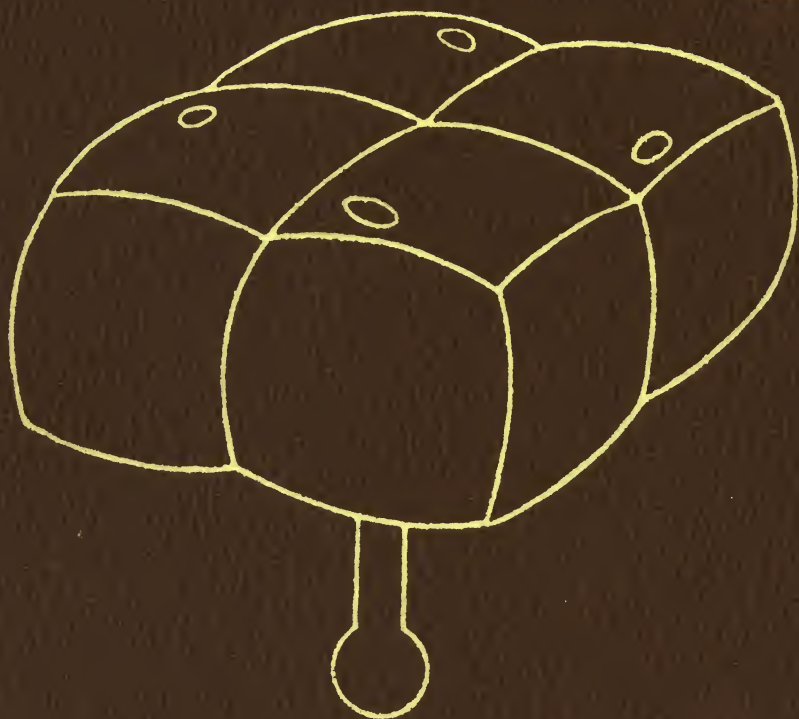


ВИРУСОЛОГИЯ

2



Издательство
«МИР»





Fundamental Virology

Chief Editors

BERNARD N. FIELDS, M. D.

The Adele Lehman Professor of
Microbiology and Molecular
Genetics
Professor of Medicine, and Chairman,
Department of Microbiology and
Molecular Genetics
Harvard Medical School and
Brigham and Women's Hospital;
and The Shipley Institute of
Medicine Boston, Massachusetts

DAVID M. KNIPE, Ph. D.

Associate Professor of
Microbiology and
Molecular Genetics
Department of Microbiology and
Molecular Genetics
Harvard Medical School
Boston, Massachusetts

Associate Editors

ROBERT M. CHANOCK, M. D.

Laboratory of Infectious Diseases
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

JOSEPH L. MELNICK, Ph. D.

Department of Virology and
Epidemiology Baylor College of
Medicine Texas Medical Center
Houston, Texas

BERNARD ROIZMAN, Sc. D.

Department of Molecular Genetics
and Cell Biology
University of Chicago
Chicago, Illinois

ROBERT E. SHOPE, M. D.

Department of Epidemiology
and Public Health
Yale University School of
Medicine
New Haven, Connecticut

ВИРУСОЛОГИЯ

в 3-х томах

2

Под редакцией Б. ФИЛДСА, Д. НАЙПА
при участии
Р. ЧЕНОКА, Б. РОЙЗМАНА, ДЖ. МЕЛНИКА,
Р. ШОУПА

Перевод с английского
канд. биол. наук А. В. ГУДКОВА,
д-ра мед. наук Е. И. СКЛЯНСКОЙ,
канд. биол. наук К. М. ЧУМАКОВА

под редакцией
проф. Н. В. КАВЕРИНА,
проф. Л. Л. КИСЕЛЕВА



МОСКВА «МИР» 1989

ББК 28.4

В52

УДК 578

Авторы: Дж. Г. П. Сиссонс, М. Б. А. Олдстоун, В. К. Йок-
лик, Сунвен Чу, Т. Мериган, Б. Мэрфи, Р. Ченок, Р. Р. Рю-
керт, К. Л. Тайлер, Б. Н. Филдс, М. Дж. Шлезингер,
Д. Бишоп, С. У. Эмерсон, Д. У. Кингсбери

Вирусология: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ./Под ред.
В52 Б. Филдса, Д. Найпа, при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана,
Дж. Мелника, Р. Шоупа. — М.: Мир, 1989. — 496 с., ил.

ISBN 5—03—000284—7

Фундаментальное руководство по вирусологии, написанное известными спе-
циалистами из США и Англии. Книга может служить учебным и справочным
пособием. На русском языке выходит в 3-х томах.

В т. 2 вошли материалы по системе интерферона, химиотерапии и иммуно-
профилактике вирусных заболеваний, а также по отдельным группам вирусов
(пикорнавирусам, реовирусам, тогавирусам, аренавирусам, буньявирусам, рабдо-
вирусам, орто- и парамиксовирусам).

Для вирусологов, молекулярных биологов, медиков, а также студентов и
аспирантов, специализирующихся в области вирусологии.

В 1905000000—349
041(01)—89 103—89

ББК 28.4

Редакция литературы по биологии

ISBN 5—03—000284—7 (русск.)

ISBN 5—03—000282—0

ISBN 0—88167—211—4 (англ.)

© 1986 by Raven Press Book, Ltd.

© перевод на русский язык,
«Мир», 1989

Ответ хозяина на вирусную инфекцию

Дж. Г. П. Сиссонс, М. Б. А. Олдстоун¹

Главным двигателем эволюции иммунной системы была необходимость преодоления организмом инфекции. Начало иммунологии как науки иногда относят к опытам Эдварда Дженнера по профилактике оспы, который, по-видимому, совершенно не представлял механизма выявленной в результате его опытов защиты от болезни. Сейчас наши знания значительно расширились, но они все еще недостаточны, и изучение вирусных инфекций продолжает оставаться в центре экспериментальных и клинических исследований иммунного ответа. Иммунитет к вирусным инфекциям имеет биологическое и социальное значение и поэтому заслуживает тщательного изучения сам по себе. Кроме того, вирусы благодаря своим специфическим особенностям представляют собой прекрасный объект для исследования фундаментальных аспектов иммунного ответа. Иммунологов вирусы привлекают тем, что с их помощью можно физиологическим путем встраивать в поверхность клетки определенные чужеродные антигены.

Эта глава посвящена ответу хозяина на заражение вирусом. Особое внимание в ней будет уделено трем аспектам. Первый из них — *специфический иммунный ответ*. Правда, существуют также важные типы неспецифического иммунного ответа, имеющие отношение к ограничению и подавлению вирусной инфекции. Сюда относится система комплемента, мононуклеарно-фагоцитарная система и индукция интерферонов, которые могут влиять на иммунокомпетентные клетки, а также на природные клетки-киллеры (клетки-убийцы). Неспецифический иммунитет следует учитывать в тех случаях, когда имеются данные о его самостоятельной или совместной со специфическим иммуните-

¹ J. G. P. Sissons, Department of Medicine and Virology, Royal Postgraduate Medical School, London.

Michael B. A. Oldstone, Department of Immunology, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, Ca, 92037.

том роли в ограничении вирусных инфекций. Второй аспект — *иммунные ответы человека*. Большая часть исследований на людях, о которых здесь пойдет речь, опирается на данные, полученные в опытах на животных, в частности на мышах; некоторые из этих данных, особенно иммуногенетические, мы используем в данной главе. Третий аспект касается *общих закономерностей*. Здесь мы избирательно рассмотрим данные по иммунологии некоторых вирусных инфекций; детальные сведения об отдельных вирусах приводятся в соответствующих главах. Следует помнить, что отдельные вирусы имеют индивидуальные особенности, которые могут влиять на иммунный ответ. Главная из них — способность некоторых вирусов заражать иммунокомпетентные клетки и повреждать их функции.

Индукция специфического иммунного ответа к вирусам

Обсуждение этого вопроса требует понимания основ иммунологии. Здесь мы только коротко упомянем основные, наиболее важные концепции. Для детального ознакомления с данной областью читатель должен обратиться к фундаментальным руководствам [3, 29].

Лимфоциты делятся на два класса: В-клетки и Т-клетки, причем и те и другие образуются из стволовых клеток костного мозга. Т-клетки происходят из стволовых клеток, дифференцирующихся в тимусе, и являются функционально гетерогенными. Их гетерогенность подтверждается тем, что субпопуляции Т-клеток имеют различия не только по функциональным свойствам, но и по фенотипическим поверхностным маркерам. В-клетки не подвергаются дифференцировке в тимусе — они представляют собой лимфоциты, которые после дифференцировки в плазматические клетки синтезируют различные классы иммуноглобулинов, составляющие репертуар специфических антител. В-клетки находятся под контролем Т-клеток и не способны к самостоятельной дифференцировке; помимо специфического антигенного стимулирования они нуждаются в помощи Т-лимфоцитов (Т-хелперов), которые обеспечивают их специфическими факторами пролиферации и дифференцировки. Другие Т-клетки (Т-супрессоры) могут подавлять образование антител В-клетками.

Т-клетки обеспечивают те функции, которые прежде расплывчато классифицировали как «клеточный иммунитет» и которые, как было экспериментально показано, важны для приобретения устойчивости к вирусным инфекциям. Анализ индукции и супрессии различных эффекторных функций Т-клеток (хелперная и супрессорная функции, Т-клеточная цитотоксичность и осуществление гиперчувствительности замедленного типа)

относится к наиболее бурно развивающимся областям иммунологии, и поэтому в настоящее время исчерпывающее изложение вряд ли возможно. Взаимодействие Т-клеток с другими клетками иммунной системы осуществляется с помощью продуктов генов главного комплекса гистосовместимости, или *МНС* (от англ. major histocompatibility complex). Однако молекулярные основы ограничений, налагаемых *МНС* на эти взаимодействия, пока не выяснены. Структура рецептора для антигена на поверхности Т-клеток была расшифрована лишь недавно, тогда как структура поверхностного иммуноглобулина — рецептора для антигена на В-клетках — изучена достаточно хорошо.

Прежде чем обсуждать индукцию и экспрессию иммунного ответа, необходимо в общих чертах описать *МНС*. Подробности читатель найдет в последних обзорах [29, 47].

Гены главного комплекса гистосовместимости

Главный комплекс гистосовместимости — это набор генов в коротком плече хромосомы 6 человека (или хромосомы 17 мышей) (рис. 14.1). Гены *МНС* кодируют различные белки, которые можно подразделить на три класса.

Антигены класса I экспрессируются на поверхности всех ядерных клеток и представлены у человека антигенами HLA-A, -B и -C (у мышей H2 K и D). Эти антигены представляют собой трансмембранные гликопротеины с мол. массой 44K, ассоциированные на клеточной поверхности с легкой цепью (12K), называемой β_2 -микроглобулином. Сам β_2 -микроглобулин не относится к интегральным мембранным белкам и кодируется не в той хромосоме, которая содержит *МНС*.

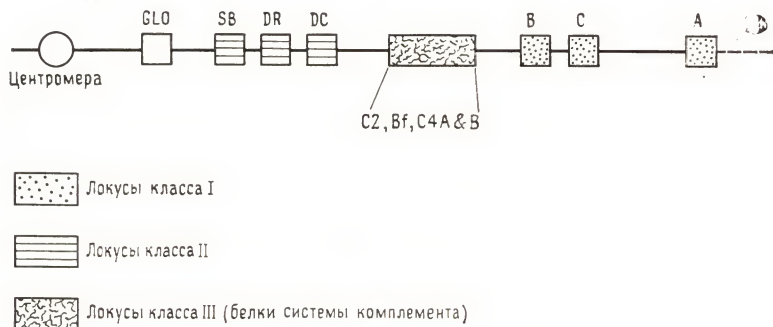


Рис. 14.1. Карта главного комплекса гистосовместимости, локализованного в коротком плече хромосомы 6 человека. Показаны известные в настоящее время локусы, кодирующие три класса *МНС*-антигенов. GLO — локус глиоксидазы.

Антигены класса II имеют более ограниченное распределение в тканях; они экспрессируются на В-клетках, на части активированных Т-клеток, на антиген-презентирующих клетках и на активированных моноцитах. Антигены класса II могут при некоторых условиях экспрессироваться также на клетках, которые раньше не относили к иммунной системе, например на эндотелиальных и эпителиальных клетках; функция антигенов на этих клетках еще не ясна. Область *MHC*, несущая гены для антигенов класса II у человека, известна как область *HLA-D* и соответствует области *I* у мышей. Продукты этих генов у человека представлены главным образом антигенами *HLA-DR* (*I-A* или *I-E/C* у мышей). Они состоят из двух гликопротеинов с мол. массой 34К и 23К, включенных в плазматическую мембрану. Недавно описаны другие локусы *D*-области, в частности локусы *SB* (от англ. secondary B, вторичные В-клетки) и *DS*.

Антигены класса III — это белки системы комплемента *C2*, *C4* и фактор В. В отличие от антигенов классов I и II антигены класса III — преимущественно белки плазмы. Почему эти белки системы комплемента кодируются *MHC*, еще неясно. Однако число данных, подтверждающих их участие в индукции иммунного ответа, постоянно растет [22].

Антигены классов I и II первоначально были описаны как трансплантационные антигены, участвующие в отторжении пересаженных органов, и именно поэтому так назван *MHC*. Однако маловероятно, чтобы отторжение было первичной функцией, для которой предназначены эти антигены. В настоящее время общепризнано, что их главной биологической функцией является управление взаимодействием между клетками, особенно между клетками иммунной системы.

Антигены класса I управляют взаимодействием между цитотоксическими Т-лимфоцитами и их клетками-мишенями. Антигены класса II контролируют взаимодействие Т-клеток с антиген-презентирующими клетками. Интересно, что вирусы сыграли главную роль в раскрытии и экспериментальном анализе функции генов *MHC* и их продуктов. Многие полагают, что именно подавление вирусов и других внутриклеточных патогенных агентов было первичной движущей силой эволюции и полиморфизма генов *MHC*, особенно для антигенов класса I. Эта точка зрения обсуждается ниже.

Наряду с *MHC* был картирован еще один набор генов — гены иммунного ответа, или *Ir*-гены (от англ. immune response). *Ir*-Гены контролируют уровень иммунного ответа на отдельные антигены. Интенсивно изучаются *Ir*-гены, связанные с *MHC*; кроме них существуют также *Ir*-гены, не связанные с *MHC*. Связанные с *MHC* *Ir*-гены впервые описаны у мышей и морских

свинок как гены, контролирующие ответ Т-клеток на синтетические Т-зависимые антигены; имеются доказательства присутствия таких генов и у человека. Большая часть *Ir*-генов, связанных с *MHC*, контролирует уровень ответа Т-хелперов на антиген и локализуется в *I-A*-области мышиного *MHC*. Однако есть также доказательства существования *Ir*-генов, контролирующих уровень ответа цитотоксических Т-клеток, в том числе ответа на вирусы; эти гены в отличие от предыдущих располагаются в *K*- или *D*-областях [52]. *Ig*-Гены охарактеризованы только в отношении их функции, однако не исключено, что в структурном отношении продукты *Ir*-генов, по крайней мере локализованных в области *I-A*, являются антигенами класса II.

Вирусы как антигены

Каждый вирус представляет собой сложную смесь антигенов. Степень этой сложности определяется количеством вирус-специфических белков. Как большинство других сложных корпускулярных антигенов, вирусы обычно высоко иммуногенны, и большая часть их белков способна вызывать антительный ответ. Высокая иммуногенность, вероятно, объясняется большим числом антигенных детерминант, доступных для распознавания Т-хелперами. Особым свойством вирусов, важным для их функционирования в качестве антигена, является способность к репликации, благодаря которой удлиняется период воздействия антигена на иммунную систему. Для индукции антительного ответа В-клеток большая часть антигенов нуждается в помощи Т-клеток (является Т-зависимой). Вместе с тем некоторые полимерные антигены, состоящие из повторяющихся субъединиц, способны вызывать В-клеточный ответ в отсутствие Т-клеток (они Т-независимы). Как и предполагали, большинство изученных вирусов оказалось Т-зависимыми антигенами. Можно также ожидать, что некоторые вирусные белки более активны в качестве антигенов, чем другие. Это, в частности, относится к вирусным гликопротеинам, экспрессированным на поверхности зараженных клеток и на поверхности вирусных частиц. Эти специфические вирусные гликопротеины — наиболее явные и доступные мишени для иммунного ответа.

Один белок обычно содержит ряд антигенных детерминант (эпитопов, или участков, способных реагировать с антителами). Эти детерминанты зависят от третичной структуры молекулы и могут содержать участки, расположенные в разных областях полипептидной цепи. Для выявления антител, реагирующих с интактным белком, можно использовать синтетические полипептиды, структура которых соответствует известным нуклеотидным последовательностям и идентична структуре определенных

пептидов белковой цепи. Для успешного осуществления такого подхода пептиды должны содержать гидрофильные группы (локализованные на поверхности интактной молекулы и, следовательно, доступные для антител); должны состоять более чем из 6 (обычно из 10—20) аминокислот; и должны быть присоединены к иммуногенному носителю. Получение подобных пептидов вирусных гликопротеинов, для которых известна аминокислотная последовательность (НА вируса гриппа, поверхностного антигена вируса гепатита В, вируса ящура, вируса бешенства), вызывает большой интерес как метод производства синтетических вакцин [27]. Показано, что антитела, индуцированные синтетическими пептидами, защищают от заражения (например, в случае вируса ящура). Этот многообещающий подход еще не применяли против вирусов, поражающих человека. В настоящее время ведутся интенсивные исследования с целью выяснения, способны ли эти небольшие пептиды вызывать полный Т-клеточный ответ, как это происходит при естественном заражении.

Презентация антигена

Имеющиеся данные позволяют предположить, что Т-хелперы распознают антиген, если он презентруется специализированными антиген-презентирующими клетками (АПК). Наряду со способными к презентации макрофагами существует специализированный класс антиген-презентирующих клеток. АПК сходны с макрофагами, но отличаются от них морфологически. К ним относятся клетки Лангерганса в коже, интердигитальные клетки, вуалевые клетки афферентных лимфатических сосудов и дендритные клетки селезенки. Дендритные клетки могут быть выделены также из периферической крови, правда, в небольшом количестве. АПК экспрессируют молекулы DR (*Ia*) и варьирующие количества рецепторов к Fc и к C3b и, вероятно, имеют общее происхождение. Детали, касающиеся АПК, читатель может найти в других источниках [20, 48]. Антиген, очевидно, презентруется на поверхности АПК в ассоциации с антигенами класса II MHC, так как для того чтобы произошло распознавание антигена, Т-хелперы и АПК должны совпадать по области DR (*I*). Как происходит презентация антигена, в частности форма, в которой антиген процессируется и презентруется на поверхности АПК, пока не установлено. Однако ясно, что из общего количества антигена, для которого доступны АПК, плазматической мембраны достигает менее 1% («иммуноген»).

Участвуя в процессе презентации антигена, макрофаги и АПК секретируют различные растворимые медиаторы. Один из главных медиаторов, ранее известный как фактор, активирую-

ший лимфоциты (ФАЛ), теперь называют интерлейкином 1 (ИЛ-1). ИЛ-1 индуцирует второй сигнал для активированных антигеном Т-клеток, сообщая им способность к пролиферации. Интересно, что ИЛ-1, возможно, идентичен «эндогенному пирогену», который был ранее описан как «макрофагальный фактор». Насколько нам известно, исследований по взаимодействию вирусов и специализированных АПК еще не проводили. Некоторые вирусы способны заражать макрофаги, но насколько при этом повреждается их антиген-презентирующая функция или другие специальные функции, неизвестно. Ясно, что эта область нуждается во всестороннем исследовании.

Индукция Т-клеточного ответа

До недавнего времени большую часть информации относительно индукции и экспрессии Т-клеточного ответа на вирусы получали из опытов, проведенных *in vivo* на мышах. Однако два последних достижения — поддержание Т-клеток в культуре и их клонирование, а также получение моноклональных антител, специфичных к молекулам поверхности Т-клеток, — дали возможность изучать Т-клеточный ответ мышей и человека *in vitro*. Поверхностные молекулы определенного типа соответствуют индивидуальной функции Т-клеток и стадии их дифференцировки (рис. 14.2). Таким образом, в зависимости от фенотипа

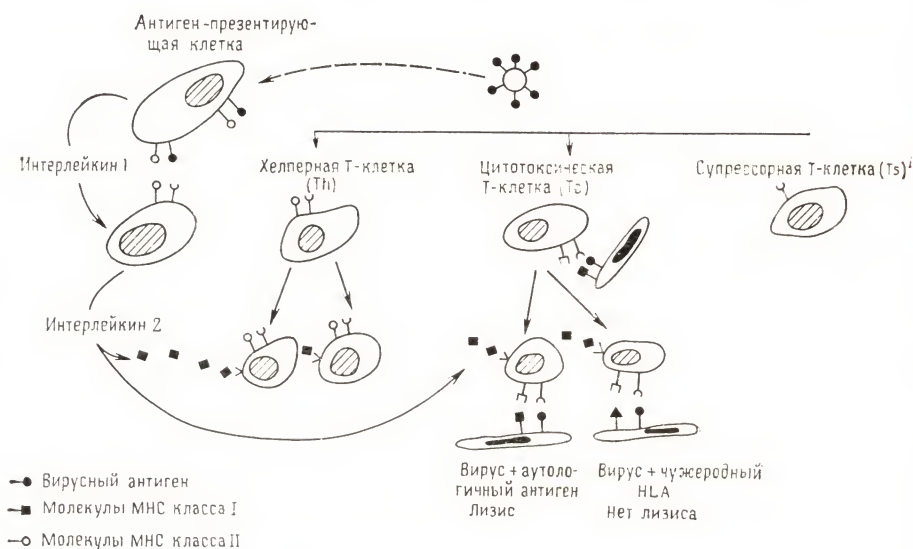


Рис. 14.2. Схема индукции Т-клеточных ответов на вирусный антиген,

Таблица 14.1. Поверхностные фенотипические маркеры Т-клеток человека¹

Моноклональные антитела к поверхностным антигенам Т-лимфоцитов человека

моноклональные антитела	определяемые популяции Т-клеток	функции
Анти-Т1 ОКТ 1 Leu 1	Все зрелые Т-клетки Все медуллярные тимоциты (Т1 присутствуют в малом количестве на корковых тимоцитах)	Гомолог мышинного Lyt 1
Анти-Т3 ОКТ 3 Leu 4	Все зрелые Т-клетки Все медуллярные тимоциты	Антитела митогенны для покоящихся Т-клеток Связаны с антиген-специфическими Т-клеточными ответами
Анти-Т4 ОКТ 4 Leu 3a, 3b	Большая часть тимоцитов 50—65% периферических Т-клеток	Эти Т-клетки участвуют во всех индукторных и хелперных функциях Цитотоксические Т-клетки, специфические для МНС-антигенов класса II
Анти-Т8 ОКТ 8 Leu 2a, 2b	Большая часть тимоцитов 25—35% периферических Т-клеток	Эти Т-клетки участвуют во всех супрессорных функциях Цитотоксические Т-клетки, специфические для МНС-антигенов класса I и рестриктированные по этим антигенам Гомолог мышинного Lyt 2

¹ Включены только наиболее широко используемые и поступающие в продажу моноклональные антитела.

клеточной поверхности, который определяют с помощью моноклональных антител, Т-клеткам могут быть приписаны те или иные функции (хелперные, супрессорные или цитотоксические). Следует отметить, что эти корреляции не абсолютны, как показано в табл. 14.1.

Мы упоминали, что взаимодействие Т-клеток с антигенами контролируется антигенами МНС. Это означает, что рецептор для антигена на Т-клетках должен иметь двойную специфич-

ность, т. е. распознавать антиген в ассоциации с антигенами МНС классов I или II. В настоящее время одна из важных задач иммунологии заключается в изучении структуры рецепторов Т-клеток.

Индукция Т-клеточных ответов, схематически представленная на рис. 14.2, обсуждается ниже.

Т-хелперы (Т-клетки-помощники)

Т-хелперы (Тх или Th, от англ. T-helper) человека характеризуются поверхностной экспрессией антигенов ОКТ 4 и Leu 3a, что показано с помощью соответствующих моноклональных антител. «Помощь» обычно обнаруживается по функциональной способности помогать В-клеткам образовывать антитела, однако помощь Т-клеток требуется также и для индукции цитотоксических Т-клеток (см. ниже). Презентация антигена АПК необходима для индукции Т-хелперов, и АПК должны иметь те же молекулы МНС класса II, что и предшественники Т-хелперов. Под действием двойного сигнала антигена и ИЛ-1 Т-хелперы пролиферируют. Некоторые из этих пролиферирующих клеток образуют растворимый фактор (лимфокин), названный интерлейкином 2 (ИЛ-2; известный также как Т-клеточный фактор роста). ИЛ-2 сообщает антиген-активированным Т-клеткам всех функциональных классов способность к делению в культуре; он является гликопротеином с мол. массой около 15К, для которого активированные Т-клетки экспрессируют специфические рецепторы. ИЛ-2 в настоящее время хорошо охарактеризован и может рассматриваться как иммунорегуляторный гормон. Вместе с тем для дифференцировки Т-клеток могут быть необходимы и другие еще неидентифицированные факторы.

Th-клетки обеспечивают «помощь» частично путем выделения ИЛ-2, а частично путем образования антиген-специфических хелперных факторов. Ответ Th-клеток на вирусы, возможно, отличается от ответа на невирусные антигены одним важным свойством. Недавно получены данные, свидетельствующие о том, что некоторые вирусы могут заставлять Th-клетки вызывать заметную поликлональную активацию В-клеток [2]. Широкое разнообразие активируемых клонов В-клеток может в результате привести к синтезу антител против собственных антигенов (аутоантител).

Для определения клеточного иммунитета к вирусам в прошлом часто использовали метод определения пролиферативного Т-клеточного ответа на вирусный антиген (измеряемого по включению ³H-тимидина); при таком определении регистрируются преимущественно Th-клетки. В будущем анализ клонов Th-клеток должен ответить на вопрос: действительно ли одни

и те же Th-клетки могут обеспечить помощь В-клеткам, помощь в индукции цитотоксических Т-клеток и помощь в развитии реакции гиперчувствительности замедленного типа. Кроме того, необходимо определить круг растворимых факторов, которые может производить один клон. Недавно описаны клоны Th-клеток, специфичных для пептидов, входящих в состав гемагглютинина вируса гриппа, и для пептидов HSV. Можно надеяться, что ответы на поставленные вопросы будут скоро получены [26].

Цитотоксические Т-клетки

Цитотоксические Т-лимфоциты (Тц или Тс, от англ. cytotoxic) человека способны избирательно убивать клетки-мишени, содержащие на своей поверхности «чужеродный» антиген. Цитотоксические способности Тс (и других цитотоксических эффекторных клеток, обсуждаемых ниже) обычно оценивают по их способности вызывать *in vitro* освобождение изотопа из клеток-мишеней, меченных ^{51}Cr . «Аллореактивные» Тс-клетки убивают клетки-мишени, экспрессирующие «чужие» детерминанты МНС; эти клетки широко изучены в связи с их возможной ролью в отторжении пересаженных органов. Однако Тс-клетки могут также убивать аутологичные клетки, экспрессирующие на плазматических мембранах вирусный антиген; эта последняя их роль, по-видимому, относится к истинно физиологической (в отличие от роли этих клеток в искусственной ситуации трансплантации). Тс-клетки человека относятся к клеткам, позитивным по ОКТ 8 и Leu 2a (табл. 14.1); единственным известным исключением являются аллореактивные Тс, специфические для антигенов класса II, относящиеся к фенотипу T4 или Leu 3. Экспериментальные исследования на мышах позволяют предположить, что вирус-специфические Тс-клетки представляют собой важные эффекторы, препятствующие развитию вирусных инфекций. Однако при некоторых обстоятельствах Тс-клетки при вирусных инфекциях могут повреждать ткани.

Наиболее существенно то, что индукция и экспрессия цитотоксичности Тс-клеток рестриктируется по антигенам класса I МНС (HLA-A, -B, и -C-антигенам у человека или H 2K и D у мыши). Первоначально это наблюдали на мышах, зараженных вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV). Т-клетки мышей, зараженных LCMV, убивают LCMV-инфицированные клетки-мишени только у мышей того же H2-гаплотипа и не убивают клетки H2-несовместимых мышей [51]. Такая рестрикция Тс-клеток молекулами МНС класса I подтверждена на мышах для более чем 16 различных вирусов; она свойственна также Тс, направленным против невирусных антигенов на поверх-

ности клеток [52]. Есть сообщение о человеческих Тс, характеризующихся аналогичной МНС-рестрикцией (см. ниже).

Опыты на мышах позволяют предположить, что рестрикция по МНС генетически не предопределена, а приобретается предшественниками Тс во время их дифференцировки в тимусе. Для индукции Тс-ответа вирус должен быть презентируван в комплексе с клеточными антигенами класса I; возможно, вирусный антиген включается в плазматическую мембрану презентирующей клетки.

У мышей выраженность Тс-ответа на индивидуальный вирус контролируется генами иммунного ответа, расположенными в локусах H2 К или D. Это позволяет предположить, что одни индивидуальные H2-гаплотипы плюс вирус вызывают более сильный Тс-ответ, чем другие. Есть также данные исследования на людях, показывающие, что некоторые антигены класса I ассоциируются с низким Тс-ответом на отдельные вирусы. Делаются попытки объяснить этим значительный полиморфизм *HLA-A* и *-B*-локусов у человека. Согласно данному представлению, широкий ряд антигенов класса I, имеющийся в популяции, должен обеспечить адекватный Тс-ответ на различные вирусы, с которыми сталкивается данная популяция [12, 13]. Кроме того, выдвинуто предположение, что связь различных заболеваний человека с индивидуальными *HLA*-антигенами может быть следствием генетического контроля этого типа Тс-ответа на инфекцию.

У мышей с острой вирусной инфекцией пик Тс-активности наблюдается примерно через 5—9 дней после ее начала; затем образуются Тс-клетки памяти, и после вторичного контакта с возбудителем инфекции Тс-клетки возникают быстрее. Вторичный вирус-специфический Тс-ответ может сформироваться *in vitro* в результате совместного культивирования клеток селезенки или моноцитов периферической крови с вирусом или с инфицированными вирусом клетками. Изучение вирус-специфического Тс-ответа обычно сводилось к наблюдению вторичной стимуляции *in vitro*. Недавно несколькими исследователям удалось получить клоны мышинных вирус-специфических Тс-клеток, поддерживаемых в ИЛ-2-зависимой культуре. В этих исследованиях было выявлено несколько интересных моментов. Некоторые мышинные специфические к вирусу гриппа клоны Тс, контролируемые H2, были, кроме того, аллореактивными; они убивали незараженные клетки другого H2-гаплотипа [5]. Таким образом, высокая частота аллореактивных Тс может отражать тот факт, что Тс, специфические к комплексу вируса с собственными МНС-антигенами класса I, способны к перекрестным реакциям с чужеродными МНС-антигенами класса I. Исследования, проведенные со специфическими к LCMV клонами Тс,

реактивными против ряда штаммов LCMV, показали, что Тс распознают консервативные участки вирусных гликопротеинов [8].

Рестрикция Тс по МНС вызывает особый интерес в связи с ее причастностью как к рецепторам Тс, так и к нормальной биологической роли антигенов МНС класса I. Очевидно, рецепторы Т-клеток должны распознавать как антиген вируса, так и молекулы МНС класса I. Однако вопрос о том, имеют ли Т-клетки два различных рецептора или только один, распознающий комплекс обеих молекул, остается нерешенным. В отношении экспрессии на поверхности зараженной клетки можно сказать, что если комплекс между вирусными гликопротеинами и молекулами МНС вообще формируется, то это должно происходить лишь после их независимого включения в плазматическую мембрану, так как имеющиеся данные указывают на отсутствие ассоциации между указанными молекулами во время внутриклеточного процессинга.

При обсуждении вопросов регуляции и проявления активности Т-клеток следует упомянуть также об интерферонах (ИФН). До недавнего времени ИФН привлекали внимание главным образом в связи с их антивирусным действием. Однако нарастает количество данных, свидетельствующих о том, что ИФН играют роль в иммунорегуляции (кроме того, как описано ниже, ИФН могут увеличивать цитотоксичность естественных киллеров). Т-клетки отвечают выделением γ -ИФН не только на вирусы, но и на любой специфический антиген, а также на митогены. В более низких, чем это необходимо для индукции антивирусного состояния, дозах γ -ИФН может вызывать увеличение синтеза МНС-антигенов в различных клетках и их экспрессию на клеточной поверхности. Индуцируемые главным образом вирусами, а не иммунологическими стимулами α - и β -ИФН дают сходный эффект, однако он проявляется только при дозах, необходимых для экспрессии их антивирусной активности. Предполагают, что этот эффект влияет на восприимчивость клеток-мишеней к лизису Тс-клетками [50].

Т-супрессоры

Обнаружена также субпопуляция Т-лимфоцитов, способная подавлять иммунный ответ. Т-супрессоры (Ts, от англ. T-suppressor) у человека пока не удается отличить по их поверхностному фенотипу от Тс. Механизм формирования таких клеток неясен; возможно, это происходит по гомеостатическому механизму обратной связи в ответ на пролиферацию клеток-хелперов. Большая часть данных свидетельствует о том, что Т-супрессоры проявляют свой подавляющий эффект, действуя на Т-хелперы. Однако они могут и непосредственно угнетать либо

эффекторные Т-клетки, либо В-клетки. Возможно, Т-супрессоры играют решающую роль в индукции толерантности к чужеродным и собственным антигенам, и, следовательно, дефект функции супрессорных клеток может быть причиной аутоиммунных заболеваний. Неясно, являются ли супрессорные и цитотоксические Т-клетки обязательно различными субпопуляциями. В настоящее время нет моноклональных антител, которые различали бы эти две разновидности клеток у человека; ответ на поставленный выше вопрос должны дать опыты с клонированными популяциями. Есть основание предполагать, что Ts-клетки принимают участие в иммунном ответе на вирусы и на другие антигены. Опыты на мышах показали, что *in vivo* образуются Ts-клетки, способные подавлять реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ или ДН, от англ. *delayed hypersensitivity*) на вирусы гриппа, Сендай и HSV. Эти Ts-клетки антиген-специфичны, и в случае переноса их сингенным реципиентом подавляют продукцию ДН-клеток, рестриктированных по I-области. Опубликованы также доказательства существования Ts-клеток, которые угнетают продукцию К/D-рестриктированных вирус-специфических Т-клеток, причем Ts-клетки лучше индуцируются инактивированным вирусом [1]. В связи с этим высказано предположение, что индукция различных типов Ts-клеток, вероятно, зависящая от того, какой вирус вводят, живой или инактивированный, может в значительной мере влиять на клиническую картину последующей вирусной инфекции. Аналогичных исследований клеток-супрессоров у человека не проводили, в частности потому, что при изучении ДН *in vitro* сталкиваются с большими трудностями.

Формирование В-клеточного ответа и антител

Рецептор В-клетки для антигена представляет собой иммуноглобулин, экспрессирующийся как мембранный белок. Структура и генетика иммуноглобулинов сейчас хорошо изучены. В процессе своего развития В-клетки вначале экспрессируют на своей поверхности IgM, а затем различные классы тяжелых цепей IgG(γ), IgA(α), IgD(δ). Во всех В-клетках могут экспрессироваться IgM и IgD, однако с момента начала экспрессии тяжелой цепи какого-либо одного класса, кроме μ , клетка секретирует иммуноглобулины только этого класса. После встречи с антигеном В-клетка обычно дифференцируется либо в зрелую плазматическую клетку, которая секретирует иммуноглобулины только одного класса, представляющие собой специфические антитела, либо в В-клетку памяти. Дифференцировка В-клеток находится под контролем образуемых Т-клетками особых факторов роста и дифференцировки В-клеток, аналогичных

факторам, участвующим в дифференцировке самих Т-клеток. Как правило, В-клеточный ответ на вирусные антигены не отличается от ответов на другие антигены. В ответ на вирусную инфекцию обычно формируются антитела всех классов. Особого упоминания заслуживают антитела класса IgA. Формирование местных секреторных антител IgA на поверхности слизистых имеет особое значение для формирования устойчивости к вирусам, обычно проникающим в организм через дыхательный или кишечный эпителий. Для успешной индукции секреторных IgA в кишечнике вирус должен вступить в контакт с пейеровскими клетками (лимфоидной тканью кишечника). После формирования местного ответа В-клетки памяти, образующие IgA, мигрируют в другие области кишечника. Это показано на людях, получавших перорально полиовакцину [34].

Идиотипы и теория сети

У каждой молекулы иммуноглобулина участки, связывающиеся с антигеном, сами тоже несут антигенные детерминанты, известные как идиотипические, или идиотопы. Идиотипы могут распознаваться антиген-связывающими участками других антител. Эти антиидиотипические антитела также могут иметь свои собственные идиотипы. Антиидиотипические антитела часто представляют «подобие» или «образ» антигена, против которого направлено антитело, несущее идиотипическую детерминанту. Следовательно, они могут конкурировать с антигеном за участки связывания.

Теория сети, выдвинутая Ерне, распространяет эту концепцию на всю иммунную систему, рассматривая последнюю как сеть взаимодействующих идиотипов и антиидиотипов, которые реагируют также со специфическими внешними антигенами. Когда внешний антиген проникает в систему и вызывает размножение специфических клонов клеток, несущих индивидуальные идиотопы, система изменяется и происходит накопление антиидиотипических, анти-антиидиотипических и т. д. антител. Предполагают, что это явление играет регуляторную роль в модулировании иммунного ответа. Аналогичные принципы можно применить к рецепторам Т-клеток, которые также несут идиотипы [21].

Эти идеи стимулировали проведение многих исследований, большая часть которых подтверждает теорию сети. Антиидиотипические антитела обнаружены при некоторых аутоиммунных заболеваниях и инфекциях человека. Имеет ли теория сети какое-либо существенное значение для вирусных инфекций? Помимо регуляторной роли в иммунном ответе антиидиотипические антитела, имеющие «образ» антигена, могут конкурировать

вать с антигеном за специфические клеточные рецепторы, не являющиеся антителами. Например, моноклональные антиидиотипические антитела против антител к гликопротеину реовируса предотвращают связывание реовируса с его специфическими рецепторами, находящимися на клеточной поверхности; по-видимому, это связано с тем, что антиидиотипические антитела могут действовать как лиганды для рецепторов [13].

Клеточные эффекторные механизмы

Обсудив индукцию иммунного ответа против вирусов, в следующих разделах мы обратимся к механизмам и последствиям экспрессии этого ответа в отношении вирусов и клеток, зараженных вирусами.

Естественные киллеры

Лимфоциты периферической крови человека (ЛПК) при цитотоксических реакциях *in vitro* спонтанно лизируют культивируемые клетки различных линий (в частности, опухолевых), а также клетки, зараженные вирусами. Этот лизис не имеет обычной иммунологической специфичности, поэтому он назван естественной цитотоксичностью, а класс ответственных за него эффекторных клеток назван «естественные киллеры» (англ. natural killer, NK). Эти клетки и их возможные функции привлекли в последнее время значительное внимание. Выдвинуто предположение, что они могут играть биологическую роль в трех важных областях: а) в механизме иммунологического надзора, направленного против опухолевых клеток, б) в разрушении клеток, зараженных вирусами, и в) в регуляции и дифференцировке нормальных клеток костного мозга и в отторжении трансплантированного костного мозга. Функцию NK обычно оценивают по цитотоксичности в отношении чувствительных клеток, меченных ^{51}Cr . Как правило, для NK человека используют клеточную линию K562. Природа и происхождение NK еще не установлены, так что их определяют в основном по функции. Активностью NK обладает небольшая популяция морфологически характерных больших лимфоидных клеток с азурофильной зернистостью в цитоплазме, так называемых больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ). Большинство клеток NK не несет маркеров Т-клеток, но имеет рецепторы для Fc-участка IgG человека [18, 41].

Цитотоксическая активность клеток NK усиливается интерфероном. Контакт лимфоцитов периферической крови с интерфероном приводит к увеличению цитотоксичности в отношении

клеток-мишеней. БГЛ могут не только продуцировать интерферон, но и отвечать на него. Этот феномен особенно существен для способности НК убивать клетки-мишени, зараженные вирусом (см. ниже) [42].

Клетки НК отвечают также на ИЛ-2, который увеличивает их цитотоксичность и поддерживает их непрерывный рост *in vitro*. Однако в отличие от Т-клеток НК спонтанно растут в присутствии ИЛ-2, не требуя предварительной активации антигеном или лектином [17].

Столь различные характеристики привели к естественному вопросу о происхождении клеток НК: от какой линии клеток, лимфоцитов или моноцитов они берут свое начало. К тому же отмечена дефектность активности клеток НК человека при синдроме Чедьяк—Хигаши и мышей линии «beige»; в обоих случаях характерны дисфункция лизосом и дефектная киллерная активность [18].

Способность НК убивать клетки, зараженные вирусами, исследовали очень интенсивно. При инкубации с ЛПК клетки, зараженные вирусом, вызывают выделение лимфоцитами ИФН, что наблюдали в их микроокружении в лунке при проведении теста на цитотоксичность. Этот интерферон увеличивает цитотоксичность клеток НК, находящихся в популяции ЛПК, в результате чего НК убивают больше зараженных вирусом клеток, чем незараженных. Указанный эффект привел к неправильной интерпретации ряда более ранних исследований, проведенных прежде, чем были открыты клетки НК. В этих исследованиях был сделан ошибочный вывод о *Т-специфическом* цитотоксическом эффекте, осуществляемом ЛПК в отношении клеток-мишеней, зараженных вирусами. Вообще чувствительность индивидуальных клеток к НК-лизису прямо коррелирует с их способностью вызывать выделение интерферона в ЛПК. Существуют также доказательства *защиты* интерфероном незараженных клеток от НК-лизиса. Интерфероны α , β и γ способны усиливать активность НК.

Есть сообщения, что вирусные гликопротеины как находящиеся в свободном вирусе, так и экспрессируемые на клеточных мембранах, увеличивают активность НК и независимо от ИФН [9].

Механизмы активации НК присущи различным вирусам. Поэтому возникла идея, что НК является фактором неспецифической иммунной защиты, который способен действовать против зараженных вирусом клеток еще до формирования специфических механизмов защиты, таких как антитела и Т-клетки. Роль НК *in vivo* еще неясна; однако их устранение *in vivo* антисывороткой к обнаруженному на клеточных мембранах клеток НК гликолипиду асиало-GM1 приводит к усилению репликации не-

которых вирусов, что позволяет допустить возможность их участия в ограничении распространения вирусов [7].

Антителозависимая клеточная цитотоксичность

Клетки, несущие на своей поверхности антитела класса IgG, могут быть лизированы ЛПК. Ответственные за это клетки-эффекторы входят в состав «нулевой» (ни Т-, ни В-) фракции ЛПК и имеют Fc-рецепторы. Этот феномен известен как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Клетки-эффекторы называют К-клетками (от англ. killer cells) или клетками-убийцами [39, 44]. По имеющимся данным трудно отделить К-клетки от НК и не исключено, что «естественное убийство» и АЗКЦ осуществляются одними и теми же эффекторами. Как упоминалось ранее, получены убедительные доказательства того, что цитотоксичность НК не зависит от антител. Следовательно, если НК и К-клетки идентичны, то одни и те же эффекторные клетки должны быть способны к связыванию с клетками-мишенями двумя способами: один из них зависит от взаимодействия между Fc-рецепторами и IgG, а другой не зависит. Количество связанного с поверхностью IgG, необходимое для того, чтобы сенсибилизировать клетку для АЗКЦ, очень невелико; оно значительно меньше количества, необходимого для того, чтобы вызывать комплементзависимый опосредованный антителами лизис. Сравнительно легко продемонстрировать АЗКЦ *in vitro*, инкубируя с ЛПК клетки-мишени, покрытые антителами и меченные ^{51}Cr . Зараженные вирусом клетки-мишени, экспрессирующие на своих плазматических мембранах вирус-специфические антигены, могут быть убиты с помощью АЗКЦ в присутствии соответствующих специфических IgG. Трудно определить роль этого механизма *in vivo*, так как не легко отличить АЗКЦ от прямого действия антител или от действия НК как таковых. Есть данные о том, что в АЗКЦ могут участвовать нейтрофилы и макрофаги. Важным моментом, касающимся АЗКЦ, является иммунологическая неспецифичность клеток-эффекторов; специфичность в реакцию вносится антителами.

Гиперчувствительность замедленного типа

Теперь мы обсудим клеточный эффекторный механизм, осуществляемый специфически сенсибилизированными Т-лимфоцитами. Реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) — это воспалительные реакции тканей; для них характерна инфильтрация активированными макрофагами участков, в которых присутствуют антигены. Реакция зависит от специ-

фически сенсibilизированных Т-клеток и достигает максимума через 24—48 ч после введения антигена. Примером ГЗТ служат уплотнения, появляющиеся в месте внутрикожного введения туберкулина, у индивидуумов, ранее зараженных возбудителем туберкулеза.

ГЗТ интенсивно изучали в экспериментах на животных; ясно, что она играет важную роль в устойчивости хозяина к внутриклеточным микроорганизмам, в том числе и к вирусам. Сенсibilизированные Т-клетки вырабатывают ряд растворимых медиаторов, ответственных за привлечение и активацию макрофагов. Среди клеток, выявляемых гистологически при реакции ГЗТ, преобладают макрофаги. Из медиаторов реакции ГЗТ наиболее полно изучен выделяемый Т-клетками фактор торможения миграции макрофагов (ФТМ). Однако возможно, что для этой реакции нужны также фактор, вооружающий макрофаги, интерферон и др. Активированные макрофаги содержат больше лизосом, проявляют повышенную фагоцитарную активность, а также повышенную способность убивать микроорганизмы. Следует отметить, что уничтожение активированными макрофагами микробных агентов и вирусов неспецифично. Специфичность реакции ГЗТ связана с Т-клетками и их реакцией на антиген. Как следует из большого количества экспериментальных данных, для того чтобы превратить Т-клетки в клетки, обладающие ГЗТ (Т_{ГЗТ}-клетки или Td-клетки, от англ. delayed), антиген должен быть представлен на поверхности макрофагов или других презентирующих его клеток; кроме того, необходима идентичность I-области этих клеток и Т-клеток. Однако в некоторых случаях могут быть получены Td-клетки, рестриктированные по К/D. Неясно, представляют ли Td-клетки отдельную популяцию, или реакцию ГЗТ могут осуществлять Th- и Tc-клетки. Рестрикция по I-области совместима со сходством или даже идентичностью Td- и Th-клеток. Однако на основании опытов, показывающих, что перенос ГЗТ для некоторых вирусных моделей требует совместимости по H2 К/D, предполагают связь между Tc- и Td-клетками. На это же указывают недавние наблюдения, согласно которым клонированная линия мышиных цитотоксических Т-клеток, специфичная в отношении вируса гриппа, вызывает *in vivo* ГЗТ на вирус гриппа [28].

Положительный эффект ГЗТ в отношении приобретенной резистентности к внутриклеточным патогенным агентам четко показан на примере инфекции, вызванной *Listeria*. В отношении вирусных инфекций имеющиеся данные наводят на мысль, что ГЗТ может не только обеспечить некоторую защиту, но и вызывать повреждение тканей. Например, при переносе мышам Td-клеток, специфичных к вирусу гриппа, они гибнут быстрее контрольных. Это свидетельствует об очень чувствительном рав-

новесии между иммунологической защитой и повреждением тканей [1]. При переносе мышам Т-клеток-эффекторов к HSV, рестриктированных по I-области, успешно передавалась ГЗТ и наблюдалась некоторая защита. Однако эффективность освобождения организма от инфекционного вируса в этом случае меньше, чем при переносе Т-клеток, рестриктированных по двум (I и K) областям [33].

Оценка роли ГЗТ в резистентности к вирусным инфекциям у человека затруднена, так как нет разработанного количественного теста ГЗТ *in vitro*. Однако у людей наблюдается реакция ГЗТ на вирусные антигены, что подтверждается кожными пробами и тем фактом, что сенсибилизированные Т-клетки вырабатывают ФТМ к вирусным антигенам. Следовательно, такие реакции могут участвовать и в ответе хозяина на вирусную инфекцию.

Вирус-специфические цитотоксические Т-лимфоциты

Механизм индукции вирус-специфических Т-клеток и рестрикции их цитотоксичности молекулами МНС класса I уже обсуждался. В этом разделе мы рассмотрим данные о роли Тс в вирусных инфекциях человека, а также о том, какое значение они имеют в резистентности хозяина по сравнению с другими иммунологическими механизмами.

В связи с тем что вирус-специфические Т-клетки следует искать в периферической крови, где их можно обнаружить только во время острой инфекции, большинство исследователей предпочитают использовать для генерации вторичной реакции Тс тот или иной метод стимуляции вирусом *in vitro*.

Таким способом были впервые обнаружены вирус-специфические Тс человека для вируса гриппа. ЛПК от серопозитивных индивидуумов заражали вирусом гриппа А (дающим в лимфоцитах abortивную инфекцию с экспрессией гликопротеинов, но без образования инфекционного вируса) и культивировали 5 дней. В результате возникли специфические к вирусу гриппа Тс, токсичность которых была HLA-рестриктирована по антигенам МНС класса I. Эти Тс не различали антигенные варианты вируса гриппа А, но проявляли чрезвычайную специфичность к антигенам МНС класса I. Например, они были способны распознавать серологически неразличимые варианты HLA-A2 и HLA-B27 [30]. Индивидуальный вирусный белок, распознаваемый Тс, специфическими к вирусу гриппа, еще не определен.

Другой хорошо изученной системой является вирус Эпштейна—Барр (EBV). Когда ЛПК от серопозитивных индивидуумов суперинфицировали EBV, В-клетки трансформировались и раз-

растались в колонии. После нескольких недель культивирования большая часть колоний исчезала (регрессировала), но некоторые превращались в перевиваемые В-клеточные линии. Если из культуры с самого начала удаляли Т-клетки или если первоначально проводили обработку циклоспорином А, то В-клетки бесконтрольно разрастались, и перевиваемые В-клеточные линии развивались значительно чаще. Показано, что за регрессию трансформированных В-клеток ответственны EBV-специфические Тс.

Тс, специфические для EBV, HLA-рестриктированы по антигенам класса I и распознают еще не охарактеризованный антиген, экспрессированный на В-клетках, трансформированных EBV [31]. Получены Тс-клоны, специфические для трансформированных EBV В-клеток, рестриктированные по одному антигену: HLA-A или HLA-B [49]. Частота EBV-специфических Тс-предшественников в периферической крови нормальных серопозитивных индивидуумов относительно высока. Предполагают, что эти Тс участвуют в элиминации EBV-трансформированных В-клеток *in vivo*. Например, у некоторых иммуносупрессированных индивидуумов могут развиваться EBNA-положительные В-клеточные лимфомы.

Тс, специфические к вирусу кори, получены в системе, сходной с описанной выше для вируса гриппа. Тс, специфические к цитомегаловирусу (CMV), получены от нормальных серопозитивных индивидуумов путем вторичной стимуляции *in vitro* с последующим накоплением реагирующих на антиген клеток в культуре, зависящей от ИЛ-2. Возможно, Тс играют роль в предотвращении реактивации CMV, как это предполагают для EBV [4]. Следует отметить, что возможность применения схемы вторичной стимуляции *in vitro* для формирования Тс зависит от свойств вирусов. В случае вирусов, вызывающих литическую инфекцию лимфоидных клеток, этот подход, очевидно, затруднен.

Есть сообщения, что при острых вирусных инфекциях вирус-специфические Тс-клетки в периферической крови могут быть обнаружены без стимуляции *in vitro*. Однако наблюдения такого рода, так же как и интерпретация данных, затруднительны, поскольку эффекторные Тс-клетки могут присутствовать в периферической крови в небольшом количестве и(или) локализоваться *in vivo* в местах заражения. Следует отметить также, как правило, низкое выделение ^{51}Cr и то, что необходимо исключить уничтожение клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами других типов, особенно клетками с Fc-рецепторами, вызывающими НК-эффект и АЗКЦ. Тем не менее удалось показать, что Тс присутствуют при острой коревой вирусной инфекции [23] и при заражении CMV у реципиентов трансплантатов костного

мозга [40]. Есть сообщения также, что вирус-специфические Тс присутствуют в спинномозговой жидкости детей, которые больны менингитом [24], вызванным вирусом паротита.

Таким образом, из относительно небольшого количества изученных случаев, приведенных здесь, следует, что вирус-специфические Тс выявляются как при острых, так и при персистентных вирусных инфекциях у человека; не исключено, что их образование в ответ на заражение вирусом — общераспространенное явление.

Гуморальные эффекторные механизмы

Нейтрализация вируса антителами

Антитела, играющие важную роль в подавлении вирусных инфекций, используют для выявления иммунитета к вирусам. Согласно полученным *in vitro* достоверным доказательствам, антитела классов IgG и IgM эффективно нейтрализуют вирус в жидкой фазе [11, 12, 35]. Это может быть результатом предотвращения связывания вируса со специфическими клеточными рецепторами или результатом агрегации вирусных частиц, вызванной антителами. Соединение вирусов с IgG-антителами способствует фагоцитозу мононуклеарными клетками и полиморфноядерными лейкоцитами, осуществляемому с помощью имеющихся на этих клетках Fc-рецепторов. Однако этот последний процесс может усиливать репликацию некоторых вирусов (см. выше). Дальнейшее понимание процессов, необходимых для нейтрализации, может прийти в результате исследований с моноклональными антителами. Например, моноклональные антитела к белку Е1 вируса Синдбис, которые *in vitro* не нейтрализуют вирус, тем не менее обеспечивают защиту при введении *in vivo*. Показано, что эти антитела распознают вирус-специфические участки на зараженных клетках, но не распознают их на вирионах и что для эффекта защиты необходима активация антителами комплемента [43].

В то время как основными антителами, ответственными за нейтрализацию вирусов в сыворотке, являются IgG и IgM, антитела IgA — основной класс антител, нейтрализующих вирус на поверхности слизистой. Следовательно, секреторные IgA являются важным компонентом в системе, обеспечивающей устойчивость к вирусам, которые обычно проникают в организм через респираторные пути или через кишечник. Более того, чтобы индуцировать на участке слизистой хороший секреторный IgA-ответ, необходима местная иммунизация. Классическим примером может служить живая пероральная

полиовакцина, которая значительно лучше, чем убитые парентеральные вакцины, индуцирует секреторные IgA [36]. Любые эффекты IgA следует относить к прямому действию самих антител, предотвращающих связывание вируса со слизистой. В отличие от IgG, IgA не использует эффекторные системы, такие как фагоцитарные клетки или комплемент.

Антитела IgE присутствуют в сыворотке в низкой концентрации; их основная биологическая активность проявляется в связывании с тучными клетками через специфические рецепторы. Во время реакции антигена со связанными с клетками IgE из тучных клеток выделяются медиаторы воспаления. Этот IgE-зависимый механизм считают ответственным за некоторые клинические проявления аллергии. Практически нет исследований, посвященных IgE-ответу на вирусы. Хотя, вероятно, антитела IgE к вирусным антигенам образуются, неясно, ответственны ли происходящие при этом процессы за какие-либо проявления вирусных инфекций.

Роль комплемента

Система комплемента человека включает в себя 20 белков плазмы. Механизм их последовательного взаимодействия довольно хорошо изучен. *Классический путь* активации комплемента начинается с того, что субъединица C1q макромолекулы C1 связывается с IgG или IgM в случае их соединения с антигеном или агрегации. Затем следует активация C1r и C1s. Активированный C1 последовательно расщепляет C4 и C2, в результате чего происходит сборка фермента C4b2b, расщепляющего C3 при классическом пути. Активность C4b2b ограничивается лабильностью C2b и в меньшей степени специфическими регуляторными белками, инактивирующими C4 (сюда входят белок, связывающийся с C4, и фактор I).

Альтернативный или амплификационный путь активации комплемента отличается от классического главным образом тем, что он не зависит от антител. C3 подвергается медленному спонтанному гидролизу в плазме и превращается в C3b, который в норме быстро инактивируется фактором H и фактором I в жидкой фазе или на поверхности неактивирующих частиц. Однако активаторы альтернативного пути, являющиеся по большей части корпускулярными, проявляют одну особенность: когда C3b из жидкой фазы откладывается на их поверхности, он становится относительно защищенным от фактора H. Такой защищенный C3b может связать фактор В, который расщепляется фактором D (серинпротеаза с низкой молекулярной массой) с образованием фермента C3bBb, расщепляющего C3 при аль-

тернативном пути. Этот фермент с активным участком на фрагменте Bb быстро распадается; его период полужизни продлевается пропердином (П), который связывается с C3 в бимолекулярный комплекс и замедляет распад. Важным моментом альтернативного пути является то, что C3b (сформированный либо по классическому типу, либо спонтанным гидролизом, либо с расщеплением C3 другими протеолитическими ферментами) способствует усилению расщепления C3. Следовательно, альтернативный путь является мощным биологическим контуром положительной обратной регуляции. В связи с этим следует подчеркнуть важность регуляторных белковых факторов H и I, так как в их отсутствие обычные незначительные количества C3b могут привести к неограниченной активации этого пути. На рис. 14.3 представлена схема классического и альтернативного путей активации комплемента.

После расщепления C3 в C3bBb или C4b2b могут включаться добавочные молекулы C3b с образованием C3b_nBb или C4b2b3b, а затем появляется фермент, расщепляющий C5. После расщепления C5 происходит неферментативное связывание C6-9 с C5b, что приводит к сборке комплекса C5b-9, который встраивается в липидный бислой клеточных мембран, вызывая хорошо известную картину разрушения мембран комплементом. Дополнительные подробности недавних исследований системы комплемента можно найти в обзорах [25, 32].

Комплемент усиливает нейтрализацию вирусов антителами. Это достигается благодаря увеличению размеров комплекса вирус—антитело и включению C3b в комплексы, которые затем способны связываться с находящимися на фагоцитарных клетках рецепторами к C3b. Антитела и комплемент могут также непосредственно лизировать вирусы, имеющие липидную оболочку.

Сам комплемент способен непосредственно инактивировать некоторые вирусы в отсутствие антител, например ряд ретровирусов. Это возможно благодаря тому, что некоторые вирусные белки служат рецепторами C1q [11, 12]. Альтернативным путем комплемент активируется на поверхности различных микроорганизмов, например бактерий и дрожжей. Таким образом, не исключено, что главная функция альтернативного пути заключается в неспецифическом механизме защиты хозяина, при котором появляется возможность опсонизации и лизиса различных микроорганизмов еще до развития специфического иммунного ответа. Есть данные о том, что вирусы также могут быть инактивированы альтернативным путем независимо от антител, как это показано на примере вируса Синдбис; подробности приведены в обзорах [11, 12, 19].

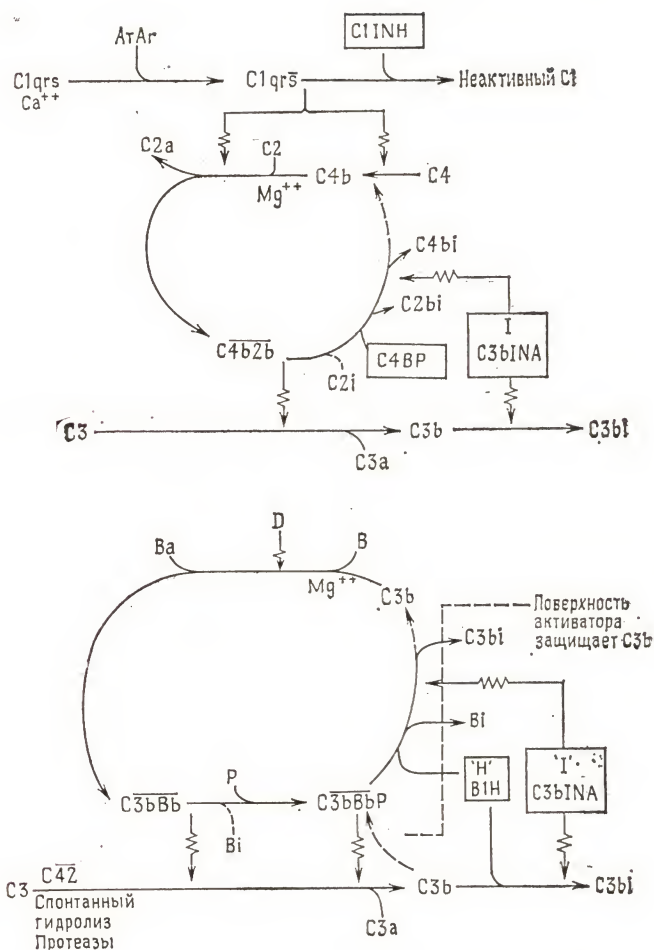


Рис. 14.3. Классический (вверху) и альтернативный (внизу) пути активации комплемента.

Лизис зараженных вирусом клеток антителами и комплементом

Антитела и комплемент могут убивать зараженные вирусом клетки *in vitro*. Клетки различных человеческих линий (эпителиальные, нервные, лимфоидные), зараженные вирусами, которые экспрессируют антигены на клеточной поверхности, лизируются человеческими сыворотками при условии содержания в них специфических антител к вирусам и функционально актив-

ного комплемента. В этом случае лизис зависит от интактного *альтернативного* пути активации комплемента. Детальный анализ этой системы с использованием в качестве модели клеток, зараженных вирусом кори, показал, что в отсутствие антител зараженные клетки активируют альтернативный путь, но для того чтобы произошел лизис, необходимы антитела. Несмотря на то что активация альтернативного пути не зависит от антител, IgG может, очевидно, увеличивать количество накопившегося C3 в этой системе и таким образом усиливать лизис [45, 46]. Как было показано, клетки, зараженные различными ДНК- и РНК-содержащими вирусами, лизируются с помощью аналогичных механизмов, что указывает на общий характер этого явления. Хотя оценить значение указанного механизма *in vivo* трудно, вероятно, повреждение клеток антителами и комплементом может осуществляться *in vivo* [38].

Значение механизмов резистентности хозяина *in vivo*

Несмотря на интенсивное изучение гуморального и клеточно-го механизмов, обсуждавшихся выше, все еще трудно адекватно оценить роль каждого из них в отдельности *in vivo* при вирусных инфекциях человека. Возможно, их роли в регуляции протекания вирусных инфекций взаимосвязаны, однако относительное значение каждого может варьировать от одного вируса к другому.

Последствия иммунодефицита

Утрата специфических компонентов иммунного ответа может быть воспроизведена в эксперименте, правда, часто этого достигают только с помощью изощренных манипуляций. Изучение состояния врожденного или приобретенного иммунодефицита у человека дает возможность определить относительную роль обсуждавшихся выше различных защитных механизмов *in vivo*. Однако подробно изучено лишь относительно небольшое число иммунодефицитных состояний, и полностью четко разграничить дефицит отдельных компонентов в ответе хозяина часто не удастся.

Синдромы иммунодефицита человека, характеризующиеся нарушением образования антител, представляют собой разнородную группу расстройств, для которых характерно повреждение различных стадий созревания В-клеток. Больные с дефектным образованием антител особенно сильно страдают от бактериальных инфекций. У них необычно часто развивается паралитический полиомиелит после вакцинации живым вирусом, и отмечена повышенная чувствительность к менингиту, вызываемому вирусами ЕСНО, и инфекциям, вызываемым вирусом

ветрянки-опоясывающего лишая (VZV) [10, 16].

Генетические повреждения системы комплемента в настоящее время хорошо изучены. Почти все они связаны с гомозиготной дефектностью структурных генов. Дефектность C1, C4 или C2 ассоциируется с повышенной частотой болезней иммунных комплексов, в частности «волчанкоподобной болезнью». Дефектность самого C3 приводит к рекуррентным бактериальным инфекциям, так же как и вторичная утрата C3, возникающая в результате неполноценности фактора I. Дефектность компонентов комплексов C5-C9, атакующих мембраны, ассоциируется с хроническими или повторными менингококковыми или гонококковыми инфекциями. Дефектность пропердина ассоциируется с нейссероуской инфекцией. Дефектность факторов В и D пока не изучена. Таким образом, отсутствие антител или комплемента, по-видимому, частично предрасполагает к бактериальным инфекциям [25].

Дефекты функций Т-клеток часто ассоциируются с вирусной инфекцией. Так же как в случае В-клеток, причины расстройств функций Т-клеток мало изучены. Однако известно, что около 20% случаев тяжелого комбинированного синдрома иммунодефицита вызвано дефектностью аденозиндезаминазы. Больные с поврежденными Т-клетками склонны к развитию генерализованной прогрессирующей осповакцинной инфекции при противосмерной вакцинации, а также к заболеваниям, вызываемым CMV, HSV, VZV. Первичные поражения Т-клеток также могут приводить к дефектной продукции антител; вместе с тем основной причиной повышения чувствительности к вирусным инфекциям в этой ситуации, вероятно, является неспособность Т-клеток (Tc и Td) элиминировать внутриклеточный вирус [10, 16].

Дефекты функций фагоцитов проявляются в увеличении случаев бактериальных заражений. Заслуживает упоминания один особый пример — синдром Чедьяк—Хигаши. При этом расстройстве нейтрофилы содержат гигантские гранулы и уничтожение захваченных микроорганизмов происходит неэффективно. У таких больных заметно снижена активность клеток НК, однако до настоящего времени нет сообщений об аналогичных ситуациях, касающихся вирусов. У мышей подобный дефект наблюдается при мутации «beige» [18, 41].

Иммунопатология вирусных инфекций

До настоящего времени иммунный ответ на вирусы рассматривался только в пределах его благотворного действия на хозяина. Однако вовлечение в иммунный процесс различных составляющих, активация этого процесса и увеличение его интенсивности могут приводить и к неблагоприятным последствиям,

содействующим патологическим реакциям. Это наблюдается в случае повреждения большого количества клеток или при повреждении клеток, связанных с жизненно важными физиологическими функциями.

Антитела могут участвовать в ряде патологических событий. Образование комплексов вирус—антитело (иммунных комплексов) представляет собой нормальную стадию в процессе освобождения от антигена; такие иммунные комплексы удаляются мононуклеарной фагоцитарной системой. Во время острой ограниченной инфекции может происходить отложение иммунных комплексов в структурах с фильтрующими базальными мембранами, такими как почечные гломерулы, синовиальные полости суставов и хориоидальные сплетения. Не исключено, что в результате такого отложения возникает ряд обычных симптомов, сопровождающих вирусную инфекцию. При персистентной инфекции с непрерывным выделением вирусного антигена комплексы могут отлагаться длительное время, вызывая хроническое воспаление (например, гломерулонефриты и васкулиты при персистентном течении гепатита В). Так как естественно встречающиеся вирусные инфекции у животных часто ассоциированы с иммунокомплексными болезнями, была выдвинута гипотеза о том, что иммунокомплексные болезни у человека могут иметь вирусную этиологию [37]. Антитела могут также усиливать репликацию в макрофагах некоторых вирусов, таких как альфавирусы. А комплексирование антител с вирусом денге, например, придает вирусу способность проникать в макрофаги путем эндоцитоза через Fc-рецепторы. Это, возможно, способствует развитию шокового синдрома денге у тех индивидуумов, которые уже имеют антитела [15].

В опытах *in vitro* обнаружено, что антитела могут связываться на поверхности зараженных клеток с гликопротеинами вируса кори и изменять экспрессию вирусных белков. Это обусловлено освобождением комплексов вирусный антиген—антитело с клеточной поверхности, а также подавлением внутриклеточного синтеза некоторых вирус-специфических белков. Предполагают, что сходная ситуация имеет место при подостром склерозирующем панэнцефалите, когда внутриклеточный вирус кори персистирует в мозгу при наличии очень высокого титра специфических антител [14].

Вирус-специфические Т-клетки также могут вызывать патологическое состояние. Одним из самых четких экспериментальных примеров служит инфекция, вызываемая LCMV, у мышей. Взрослые мыши, зараженные достаточной дозой LCMV, погибают, хотя сам по себе LCMV обладает относительно слабым цитопатическим действием. Повреждение мозга и смерть, вероятно, наступают вследствие того, что Тс-клетки атакуют зара-

женные LCMV клетки мозга [6]. Высказано, но не доказано предположение, что гепатоцеллюлярные повреждения при хронической болезни печени, вызываемой вирусом гепатита В, обусловлены действием вирус-специфических Т-клеток.

Вirusы могут приводить к патологическим состояниям, заражая иммунокомпетентные клетки. Примерами служат уже упоминавшееся заражение В-клеток EBV, заражение В- и Т-клеток вирусом кори, а также случаи заражения некоторыми вирусами макрофагов.

В той мере, в которой возможны обобщения в этом вопросе, можно заключить, что патологические последствия ответа хозяина на вирусную инфекцию характерны в основном для персистентных вирусных инфекций. В настоящее время главная задача исследователей, занимающихся вирусной иммунологией и иммунопатологией, состоит в том, чтобы понять, какова роль ответа хозяина в персистентной вирусной инфекции и как при этом вирус избегает иммунологического контроля.

Литература

1. *Ada G. L., Leung K.-N., Ertl H.* (1981). An analysis of effector T cell generation and function in mice exposed to influenza A or Sendai viruses, *Immunol. Rev.*, 58, 5—24.
2. *Ahmed R.* (1983). Viruses as B cell mitogens. In: *Concepts in Viral Pathogenesis*, ed. by A. L. Notkins and M. B. A. Oldstone, Springer-Verlag, New York.
3. *Benacerraf B., Unanue E. R.* (1982). *Textbook of Immunology*, Williams and Wilkins, Baltimore.
4. *Borysiewicz L. K., Morris S. M., Page J., Sissons J. G. P.* (1983). Human cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes—Requirements for in vitro generation and specificity, *Eur. J. Immunol.*, 13, 804—809.
5. *Braciale T. J., Andrew M. E., Braciale V. L.* (1981). Heterogeneity and specificity of cloned lines of influenza virus specific cytotoxic T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, 153—910.
6. *Buchmeier M. J., Welsh R. M., Dutko F. J., Oldstone M. B. A.* (1980). The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection, *Adv. Immunol.*, 30, 275—332.
7. *Bukoski J. F., Woda B. A., Habu S., Okamura K., Welsh R. M.* (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo, *J. Immunol.*, 131, 1531.
8. *Byrne J., Ahmed R., Casali P., Oldstone M. B. A.* (1983). Cytotoxic T lymphocyte clones induced by lymphocytic choriomeningitis virus (Abstr.), *Fed. Proc.*, 42, 1373.
9. *Casali P., Sissons J. G. P., Buchmeier M. J., Oldstone M. B. A.* (1981). In vitro generation of human cytotoxic lymphocytes by virus—viral glycoproteins induce non-specific cell mediated cytotoxicity without release of interferon, *J. Exp. Med.*, 154, 840—855.
10. *Cooper M. D., Lawton A. R., Miescher P. A., Muller-Eberhard H. J.*, eds. (1979). *Immune deficiency*, Springer Semin. Immunopathol., 1.
11. *Cooper N. R.* (1979). Humoral immunity to viruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 6, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, Plenum Press, New York.
12. *Cooper N. R., Welsh R. M.* (1979). Antibody and complement dependent viral neutralization, *Springer Semin. Immunopathol.*, 2, 285—310.

13. *Fields B. N., Green M. I.* (1982). Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: Implications for prevention and treatment, *Nature*, **300**, 19.
14. *Fujinami R. S., Oldstone M. B. A.* (1981). Alteration in expression of measles virus polypeptides by antibody—molecular events in antibody induced antigenic modulation, *J. Immunol.*, **125**, 78—85.
15. *Halstead S. B., O'Rourke E. J.* (1977). Dengue virus and mononuclear phagocytes, *J. Exp. Med.*, **146**, 201—217.
16. *Hayward A.* (1982). Immunodeficiency. In: *Clinical Aspects of Immunology*, ed. by P. J. Lachmann and D. K. Peters, pp. 1658—1712, Blackwell Scientific, Oxford.
17. *Henney C. S., Kuribayashi K., Kern D. E., Gillis S.* (1981). Interleukin 2 augments natural killer cell activity, *Nature*, **291**, 235.
18. *Herberman R. B.* (1982). NK Cells and Other Natural Effector Cells, Academic Press, New York.
19. *Hirsch R. L.* (1982). The complement system: Its importance in the host response to viral infection, *Microbiol. Rev.*, **46**, 71—85.
20. *Humphrey J. H.* (1982). The fate of antigens. In: *Clinical Aspects of Immunology*, ed. by P. J. Lachmann and D. K. Peters, pp. 161—186, Blackwell Scientific, Oxford.
21. *Jerne N. K.* (1975). The Immune System: A web of V-domains (Harvey Lect. 70), p. 93, Academic Press, New York.
22. *Klaus G. G. B., Humphrey J. H.* (1977). The generation of memory cells. I. The role of C3b in the generation of B memory cells, *Immunology*, **33**, 31.
23. *Kreth H. W., ter Meulen V., Eckert G.* (1979). Demonstration of HLA restricted killer cells in patients with acute measles, *Med. Microbiol. Immunol.*, **165**, 203—214.
24. *Kreth H. W., Fleischer B.* (1983). Clonal analysis of HLA restricted virus specific cytotoxic T lymphocytes from CSF in mumps meningitis, *J. Immunol.*, **130**, 2187—2190.
25. *Lachmann P. J., Peters D. K.* (1982). In: *Clinical Aspects of Immunology*, ed. by P. J. Lachmann and D. K. Peters, pp. 18—47, Blackwell Scientific, Oxford.
26. *Lamb J. R., Woody J. N., Hartzman R. J., Eckels D. D.* (1982). In vitro influenza virus-specific antibody production in man: Antigen specific and HLA restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes, *J. Immunol.*, **129**, 1465—1470.
27. *Lerner R. A.* (1982). Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity, *Nature*, **299**, 592—596.
28. *Lin Y. L., Askonas B. A.* (1981). Biological properties of an influenza A virus-specific killer T cell clone. Inhibition of virus replication in vivo and induction of delayed type hypersensitivity reactions, *J. Exp. Med.*, **154**, 225.
29. *McConnell I., Munro A., Waldman H.* (1981). The Immune System, Blackwell Scientific, Oxford.
30. *McMichael A. J.* (1980). HLA restriction of human cytotoxic T cells, *Springer Semin. Immunopathol.*, **2**, 1.
31. *Moss D. J., Wallace L. E., Rickinson A. B., Epstein M. A.* (1981). Cytotoxic T cell recognition of Epstein-Barr virus infected B cells, *Eur. J. Immunol.*, **11**, 686—693.
32. *Muller-Eberhard H. J., Schreiber R. D.* (1980). The alternative pathway of complement activation, *Adv. Immunol.*, **29**, 2—47.
33. *Nash A. A., Phelan J., Wildy P.* (1981). Cell mediated immunity in herpes simplex virus infected mice: H2 mapping of the delayed type hypersensitivity response and the antiviral T cell response, *J. Immunol.*, **126**, 1260.
34. *Ogra P. L., Karzon D. T.* (1969). Distribution of poliovirus antibody in serum nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with polio vaccine, *J. Immunol.*, **102**, 1423.
35. *Ogra P. L., Morag A., Tiku M. L.* (1975). Humoral immune response to vi-

- ral infections. In: *Viral Immunology and Immunopathology*, ed. by A. Notkins, p. 57. Academic Press, New York.
36. *Ogra P. L., Karzon D. T., Righthand F., Macgillivray M.* (1968). Immuno-globulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated polio vaccine and natural infection, *New Engl. J. Med.*, **279**, 893.
 37. *Oldstone M. B. A.* (1975). Virus neutralization and virus induced immune complex disease, *Prog. Med. Virol.*, **19**, 84—119.
 38. *Oldstone M. B. A., Dixon F. J.* (1971). Acute viral infection: Tissue injury mediated by anti-viral antibody through a complement effector system, *J. Immunol.*, **107**, 1274—1280.
 39. *Perlmann P., Cerottini J. C.* (1979). Cytotoxic lymphocytes. In: *The Antigens*, Vol. 5, ed. by M. Sela, pp. 173—281, Academic Press, New York.
 40. *Quinnan G. V., Kirmani N., Esber E., Saral R., Manizchewitz J. F., Rogers J. L., Rook A. H., Santos G. W., Burns W. H.* (1981). HLA restricted cytotoxic T lymphocyte and nonthymic cytotoxic lymphocyte responses to cytomegalovirus infection of bone marrow transplant recipients, *J. Immunol.*, **126**, 2036—2041.
 41. *Rager-Zisman B., Bloom B. R.* (1983). Natural killer cells in resistance to virus-infected cells, *Springer Semin. Immunopathol.*, **4**, 397—414.
 42. *Santoli D., Koprowski H.* (1979). Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus infected cells, *Immunol. Rev.*, **44**, 125—164.
 43. *Schmaljohn A. L., Johnson E. D., Dalrymple J. M., Cole G. A.* (1982). Non-neutralising monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus encephalitis, *Nature*, **297**, 70.
 44. *Sissons J. G. P., Oldstone M. B. A.* (1980). The antibody mediated destruction of virus infected cells, *Adv. Immunol.*, **29**, 209—260.
 45. *Sissons J. G. P., Oldstone M. B. A., Schreiber R. D.* (1980). Antibody independent activation of the alternative complement pathway by measles virus infected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 559—562.
 46. *Sissons J. G. P., Schreiber R. D., Perrin L. H., Cooper N. R., Oldstone M. B. A., Muller-Eberhard H. J.* (1979). Lysis of measles virus infected cells by the purified cytotoxic alternative complement pathway and antibody, *J. Exp. Med.*, **150**, 445—454.
 47. *Steinmetz M., Minard K., Horvath S., McNicholas J., Frelinger J., Wake C., Long E., Mach B., Hood L.* (1982). A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse, *Nature*, **300**, 35.
 48. *Unanue E. R.* (1981). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation, *Adv. Immunol.*, **31**, 1.
 49. *Wallace L. E., Rickinson A. B., Rowe M., Epstein M. A.* (1982). Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell clones restricted through a single HLA antigen, *Nature*, **247**, 413.
 50. *Wallach D., Fellous M., Revel M.* (1982). Preferential effect of γ interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells, *Nature*, **299**, 833—836.
 51. *Zinkernagel R. M., Doherty P. C.* (1975). H2 compatibility requirement for T cell lysis of cells infected with LCM (different cytotoxic T cell specificities are associated with structures coded in H2K or H2D), *J. Exp. Med.*, **141**, 1427—1436.
 52. *Zinkernagel R. M., Doherty P. C.* (1979). MHC restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness, *Adv. Immunol.*, **27**, 51—177.

Интерфероны

В. К. Йоклик¹

В 1957 г. Айзекс и Линденман [110] проинкубировали инактивированный нагреванием вирус гриппа с куриной хориоаллантоисной мембраной с целью исследовать его способность интерферировать с размножением гомологичного инфекционного вируса. Они рассчитывали, что вызывающие интерференцию вирусные частицы будут устранены адсорбцией, однако, к своему удивлению, обнаружили, что способность среды подавлять размножение вируса не только не снижается, но, напротив, усиливается. Они показали, что эта интерференция вызывается совершенно новым ингибитором, отличным от частиц вируса гриппа, и назвали его интерфероном.

На протяжении последней четверти века изучение природы и механизма действия интерферона было одним из наиболее захватывающих разделов молекулярной биологии клетки и вирусологии. Эта проблема оказалась несравненно более сложной, чем казалось вначале. В частности, было показано, что интерферон состоит из многих видов молекул, которые кодируются тремя семействами генов, дивергировавших сотни миллионов лет назад. Антивирусная активность интерферонов — лишь одна из их функций, тогда как, вероятно, главной является регуляция клеточных активностей, связанных с ростом, дифференцировкой и управлением иммунным ответом.

Изучение интерферона развивалось в нескольких направлениях. Для того чтобы дать логическую схему развития исследований интерферона, мы начнем с исторического экскурса по работам, связанным с этим вопросом, отмечая ключевые открытия, а затем подробно рассмотрим разделы, в которых уже достигнуто существенное понимание.

¹ W. K. Joklik, Department of Microbiology and Immunology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710.

Четвертьвековая история исследований интерферона может быть разделена на три периода. В течение первого периода, продолжавшегося с 1957 г. до середины 60-х гг., основной упор делался на разработку систем для изучения антивирусной активности. Установили, что интерферон — белок, кодируемый хозяином, и что существуют три класса интерферонов; в первый класс входят интерфероны, образующиеся в основном в лейкоцитах (называемые теперь α -интерферонами), во второй — интерфероны, синтезирующиеся в основном в фибробластах (β -интерфероны), и в третий — интерфероны, образующиеся в стимулированных лимфоцитах (γ -интерфероны, «иммунные», или «интерфероны класса II» по существовавшей тогда терминологии). Клетки, как правило, не образуют заметного количества интерферона, однако его синтез может быть индуцирован под действием разных факторов, первым из которых является вирусная инфекция. Индукция интерферона требует синтеза как РНК, так и белка [74, 95, 238, 257]. В одном из наиболее демонстративных опытов было показано, что если клетки предварительно обработать интерфероном, то размножение вируса леса Семлики подавляется, однако если одновременно с интерфероном добавить актиномицин D, то вирус размножается нормально. Эти опыты свидетельствуют о том, что сам интерферон не является прямым антивирусным агентом; скорее всего он вызывает антивирусное состояние путем стимуляции образования некоего белка или белков, которые и служат собственно эффекторами подавления размножения вируса. Теперь известно несколько белков, индуцируемых обработкой клеток интерфероном (см. ниже). Однако остается неясным, являются ли они действительными ингибиторами размножения вируса.

Параллельно с исследованиями основных характеристик индукции антивирусного состояния предпринимались интенсивные попытки очистить интерферон, причем эти попытки натолкнулись на неожиданные препятствия. Выяснилось, что интерфероны обладают чрезвычайно высокой биологической активностью; в антивирусное состояние клетку могут привести менее чем 50 молекул интерферона. Таким образом, хотя в производстве миллионов единиц интерферона в культуре клеток и не было сложностей, число молекул интерферона, синтезированных при этом, было лишь в 10—50 раз больше, чем число единиц его активности, и, следовательно, по массе это были очень маленькие количества интерферона. Материал, из которого приходилось начинать выделение интерферона, часто содержал не более 0,001—0,01% интерферона. Эта низкая концентрация в сочетании с очень малым суммарным количеством интерферона была серьезным препятствием для его очистки.

На следующих этапах исследования попытались выяснить

механизм антивирусной активности. Поскольку интерферон подавляет размножение как РНК-содержащих, так и ДНК-содержащих вирусов, Йоклик [118] предположил, что интерферон подавляет функцию, общую для репликативных циклов этих вирусов, а именно трансляцию ранних вирусных мРНК (т. е. РНК, входящей в состав вирусных частиц, в случае РНК-содержащих вирусов с позитивным геномом и мРНК, транскрибированной с родительского вирусного генома, в случае других вирусов). Это предположение оказалось справедливым для вируса осповакцины [119] и ряда других исследованных впоследствии систем.

В течение второго периода, длившегося с середины 60-х до середины 70-х гг., на очистку интерферона не жалели усилий. Важным достижением, полученным в ходе этих работ, которые наконец увенчались успехом [126], было осознание того, что существует не один, а несколько молекулярных видов каждого из интерферонов человека (α и β). Это подготовило почву для последующего открытия семейств интерфероновых генов (см. ниже). Использовали два приема, оказавшихся решающими для очистки интерферона: иммуноаффинную хроматографию и нечувствительность интерферона к додецилсульфату натрия (ДСН); последняя позволила применить электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН как эффективный заключительный этап очистки. Электрофорез показал, что интерфероны, точнее β -интерферон, представляют собой гликопротеины. По данным Дорнера и сотр. [58], довольно широкая полоса, которую дает β -интерферон в геле с ДСН, существенно сужается, если интерферон сначала обработать гликозидазами.

Второй важный результат, полученный в этот период, состоял в следующем: удалось показать, что интерферон обладает не только антивирусной активностью, но также регуляторной активностью в отношении клеток и способностью подавлять их размножение. Ранее на это указывали многочисленные данные, однако окончательное доказательство стало возможным только после полной очистки интерферона, когда было показано, что материал, содержащийся в полосе интерферона из полиакриламидного геля с ДСН, обладает не только антивирусной активностью, но и способностью подавлять рост клеток [228]. Осознание того факта, что интерферон влияет на клеточные функции, стимулировало многочисленные исследования: исследование интерферонов как лимфокинов, т. е. изучение их способности осуществлять иммунорегуляторные функции; исследование их влияния на дифференцировку, включая индукцию синтеза определенных белков и ферментов; а также исследование их способности подавлять размножение клеток. Последняя область приобрела существенное значение после того, как Грес-

сер и сотр. [86] показали, что интерфероны увеличивают продолжительность жизни мышей с асцитом (т. е. подавляют рост клеток опухоли). Вскоре были предприняты попытки применить интерферон для лечения рака у человека. В первых опытах усилия были направлены против остеогенной саркомы [229], а вскоре появились исследования и на других опухолях. Эти работы по своему характеру долгосрочны, и поэтому в них еще не получено результатов, позволяющих сделать окончательное заключение. Параллельные клинические испытания, в которых используют антивирусные свойства интерферона, проводят с середины 60-х гг., но пока интерферон не стал важным оружием в борьбе с вирусами. По-видимому, он способен приостанавливать течение персистентных вирусных инфекций и может найти применение в этой области.

Фактически именно необходимость клинических испытаний привела к третьему периоду исследования интерферона, начиная с середины 70-х гг. Клинические испытания требуют больших количеств интерферона — больших не по массе, а по сравнению с тем количеством, которое можно легко получить в клетках человека *in vitro*. Поэтому многие лаборатории начали клонировать гены интерферонов, и к 1979 году это удалось осуществить Танигуши и его сотрудникам [234]. Вскоре было показано, что геном человека содержит многочисленные гены и псевдогены α -интерферона, несколько генов β -интерферона и один ген γ -интерферона. Эти гены локализовали в хромосомах, секвенировали и определили их эволюционные отношения. Они клонированы как в прокариотических, так и в эукариотических экспрессирующих векторах, и в результате интерфероны производят теперь в больших количествах в бактериях, дрожжах и клетках млекопитающих. Интерфероны, полученные генноинженерным путем, используют в клинических испытаниях. Генная инженерия позволяет также получать гибридные гены интерферонов, которые кодируют гибридные молекулы интерферонов с новым сочетанием доменов или с модифицированными доменами. Не исключено, что в будущем они найдут широкое применение. Именно это направление наиболее заманчиво для тех, кто пытается использовать интерферон для борьбы с болезнями.

Несколько лет назад значительное внимание привлек механизм антивирусного действия интерферона. Когда обнаружили, что интерфероны индуцируют синтез нескольких белков (ферментов), было естественно предположить, что именно эти белки являются первыми кандидатами на роль факторов, создающих и поддерживающих антивирусное состояние. Двумя наиболее обещающими в этом отношении ферментами были протеинкиназа [142, 198] и 2,5-oligo(A)-синтаза [102]. Однако,

несмотря на использование сложных биохимических методов для выделения и характеристики этих ферментов, пока не удалось доказать, что они прямо и избирательно участвуют в подавлении размножения вирусов.

Суммируя, можно отметить, что исследование интерферонов вступает в наиболее интересную фазу. Главное препятствие в прошлом — отсутствие достаточных количеств чистого интерферона — наконец преодолено, и теперь есть все для исследования действия чистых препаратов интерферона на нормальные клетки, клетки иммунной системы, опухолевые клетки и клетки, зараженные разными вирусами. В настоящее время мы обладаем также значительными количествами интерферона для лечения больных с самыми разными заболеваниями.

Природа интерферонов

Существует три класса человеческих интерферонов: α -ИФН и β -ИФН, образующиеся преимущественно в лейкоцитах и фибробластах, соответственно, в ответ на вирусную инфекцию или на разнообразные индуцирующие воздействия [92], и γ -ИФН, называвшийся ранее «иммунным» интерфероном, или интерфероном класса II, продуцируемый несенсибилизированными лимфоидными клетками в ответ на митогены и сенсибилизированными лимфоцитами при стимуляции специфическим антигеном [51] (табл. 15.1) β -ИФН и γ -ИФН относятся к гликопротеинам, однако олигосахаридные боковые группы не существенны для их биологической активности [75, 90, 128], что объясняет, почему клонированный интерферон, синтезируемый в прокариотах (см. ниже), обладает нормальной биологической активностью. Интерфероны класса α не являются гликопротеинами. α -ИФН и β -ИФН, но не γ -ИФН очень устойчивы к низким значениям pH (оба вполне стабильны при pH 2 при 4°C) и сохраняют биологическую активность в присутствии ДСН [227]. Это необычное свойство позволяет применять эффективный способ их очистки на конечных этапах выделения [93].

В молекулах интерферонов существуют два высококонсервативных домена. Один, находящийся в аминоконцевой половине молекулы, вероятно, содержит участок, связывающийся с рецептором на клеточной поверхности, а другой, находящийся во второй половине молекулы, вероятно, модулирует это связывание и осуществляет другие биологические функции [230].

Будучи изолированы из клеток и органов, интерфероны часто оказываются крупнее, чем молекулы с мол. массой 17 кДа, которые определяются их генами (см. ниже). Тому есть несколько возможных причин. Во-первых, как уже указывалось выше, некоторые интерфероны являются гликопротеинами, во-

Таблица 15.1. Свойства интерферонов человека

Тип	α (лейкоцитарный)	β (фибробластный)	γ («иммунный», или «интерферон класса II»)
Продуцируется	Периферическими лейкоцитами	Фибробластами	Лимфоцитами
Индукующий фактор	Вирусная инфекция, дцРНК	Вирусная инфекция, дцРНК	Митогены (несенсибилизированные лимфоциты); специфические антигены (сенсибилизированные лимфоциты)
Число генов	14	Не менее 2; возможно, 5	1
Наличие интронов	Нет	Нет	Есть
Хромосомная локализация	9	9, 2, 5	12
Размер белка-предшественника (число аминокислот)	166	166	166
Длина сигнальной последовательности (число аминокислот)	23	21	20
Размер зрелого белка (число аминокислот)	143	145	146
Молекулярная масса	17 000	17 000	17 000
Гликопротеин	Нет	Да	Да
Стабильность при рН 2	Да	Да	Нет
Активность в присутствии ДСН	Есть	Есть	Нет

вторых, некоторые природные интерфероны могут быть димерами, и в-третьих, при определенных условиях интерфероны могут связываться с другими белками.

Три семейства генов интерферона человека произошли от общего предшественника, но в настоящее время они не близкородственны. Эти семейства иммунологически различны; это означает, что антисыворотка, полученная против интерферона одного класса, не инактивирует интерфероны другого [93].

Интерфероны продуцируются многими, вероятно, всеми видами позвоночных. Кроме интерферонов человека подробно изу-

чены интерфероны грызунов, особенно мышей, у которых хорошо охарактеризованы α -ИФН и β -ИФН, и интерфероны птиц, особенно кур и уток, у которых β -ИФН очищен и частично охарактеризован.

Интерфероны специфичны по отношению к виду хозяина, причем основой этой специфичности, вероятно, является специфичность взаимодействия интерферона с поверхностными рецепторами клетки (см. ниже). Иногда эта специфичность очень узка. Например, куриный и утиный интерфероны дают очень низкую перекрестную активность, так же как мышинный и крысиный интерфероны. Однако, что не удивительно, имеются исключения. Например, человеческий интерферон защищает бычьи клетки даже лучше, чем бычий интерферон.

Все интерфероны имеют как антивирусную, так и антипролиферативную активность; все они дают интерференцию с размножением вирусов и регулируют разнообразные клеточные функции. Вместе с тем степень проявления этих активностей сильно варьирует в клетках разных типов. Лишь в немногих исследованиях проводили прямое сравнение действия, вызываемого интерферонами разных классов в клетках одного типа. В одном таком исследовании [200] было обнаружено, что α -ИФН и β -ИФН подавляли размножение вирусов везикулярного стоматита (VSV) и энцефаломиокардита (EMV) сильнее, чем γ -ИФН, который в то же время подавлял размножение реовируса и вируса осповакцины сильнее, чем α -ИФН и β -ИФН. Кроме того, синтез некоторых белков индуцировался сильнее под действием γ -ИФН, в то время как для других белков было справедливо обратное. В ряде случаев γ -ИФН оказывал более сильное антипролиферативное действие, особенно против раковых клеток, по сравнению с α -ИФН и β -ИФН. В общем, можно сказать, что все интерфероны активны в индукции антивирусного состояния, но активность против различных вирусов меняется в зависимости от типа клеток и класса интерферона. Однако регуляторная активность по отношению к клеткам более выражена у γ -ИФН, чем у α -ИФН или β -ИФН [200, 258]. Теперь, когда клонирование делает доступными индивидуальные природные интерфероны, а также рекомбинантные и видоизмененные интерфероны, без сомнения, будут проводиться большие работы по идентификации и детальному описанию основных функций каждого молекулярного вида интерферона и по выявлению наилучших способов их использования в клинических условиях.

Помимо хорошо охарактеризованных классов интерферонов недавно описаны еще несколько дополнительных типов. Например, иммунные лимфоциты человека синтезируют кислотолабильный α -интерферон [16], который обнаружен также в сыво-

ротках больных системной волчанкой [185]. Другой атипичный интерферон обнаружен в одноклеточных лейкоцитах человека, индуцированных фитогемагглютинином и опухолевым промоторм телеоцидином [269]. Этот новый интерферон обладает некоторыми основными характеристиками α -интерферона, но его антивирусная активность проявляется только на фибробластах человека с трисомией по хромосоме 21; он также отличается от ранее идентифицированных типов интерферона по антигенным, биологическим и физико-химическим свойствам. Наконец, необычные интерфероны, которые нейтрализуются в примерно равной степени антителами против α -ИФН и β -ИФН, были обнаружены в зараженных вирусом амниотических оболочках [62]; возможно, они играют роль в эмбриональном развитии и в иммунологической толерантности матери по отношению к плоду. Эти новые виды интерферона интересны, но их детальная характеристика — дело будущего, и если это не оговорено специально, в данной главе мы будем рассматривать преимущественно человеческие интерфероны трех основных классов.

Природа генов интерферонов

Первое клонирование гена человеческого интерферона путем обратной транскрипции интерфероновой мРНК было весьма сложной в техническом отношении задачей из-за небольшого количества имевшейся интерфероновой мРНК. Стратегия такого клонирования основывалась не на попытках выделить в качестве исходного материала полуочищенную мРНК интерферона, а на идентификации трансформантов, содержащих гены интерферонов (такими методами, как гибридизационный блок трансляции). Первые гены α -ИФН и β -ИФН были клонированы в 1980 г. [161] и в 1979 г. [234] соответственно; ген γ -ИФН человека был клонирован в 1982 г. [82]. После успешного клонирования первого гена, используя его в качестве зонда, в геномных библиотеках быстро идентифицировали другие интерфероновые гены.

В геноме человека обнаружены многочисленные гены α -ИФН; к настоящему времени идентифицировано по крайней мере 14 таких генов, а также 7 псевдогенов, причем большая их часть уже секвенирована. Все они не имеют интронов и расположены в коротком плече хромосомы 9. Это удалось показать при помощи блот-гибридизации клонированных кДНК интерферонов с ДНК из гибридных клеток человек—мышь и гибридизации *in situ* с человеческими метафазными хромосомами [174, 248]. По крайней мере часть этих генов расположена тандемно, а остальные находятся близко друг к другу; один участок в 9937 пар оснований хромосомы 9 содержит два полных гена

α -ИФН, разделенных 4363 парами оснований (гены L и J), и часть третьего (возможно, псевдогена) [249]. Кодирующие области генов L и J гомологичны примерно на 96% и каждый фланкирован примерно 3500 нуклеотидами, которые также высоко гомологичны. Повторяющаяся единица гена J фланкирована последовательностями, напоминающими те, которые фланкируют подвижные генетические элементы. Повторы, содержащие как L-, так и J-гены, расположены в области, содержащей высокоповторяющиеся последовательности генома человека.

Что касается генов β -ИФН, то с ними ситуация еще не выяснена. Один из них расположен в коротком плече хромосомы 9 и уже секвенирован; как и гены α -ИФН, он не содержит интронов. Однако вопрос о том, есть ли другие гены β -ИФН, и где они расположены, остается открытым. С одной стороны Тавернье и др. [236] просмотрели геномную библиотеку человека и обнаружили только один ген β -ИФН. С другой стороны Пита и др., [183] обнаружили мРНК β -интерферона в гибридных клетках человек — мышь, не содержащих хромосомы 9, но содержащих хромосомы 2 и 5 человека. Сагар и др. [203] нашли по крайней мере пять видов транскрибируемой мРНК β -ИФН; а Сегал и др. [216], просматривая геномную библиотеку человека, нашли шесть дополнительных генов β -ИФН. По-видимому, несколько генов β -ИФН расположены в хромосомах 2, 5, и 9. И, наконец, существует единственный ген человеческого γ -ИФН, расположенный в хромосоме 12 [54, 164] и имеющий три интрона.

Большая часть перечисленных выше генов секвенирована. Различные гены α -ИФН гомологичны между собой на 80—90%; они дивергировали от общего предшественника относительно недавно, самое большее 25 млн. лет назад [156, 211]. Поскольку дивергенция млекопитающих произошла примерно 75 млн. лет назад, организация семейства генов α -ИФН у приматов отличается от таковой у других млекопитающих.

Кодирующие последовательности семейств генов α -ИФН и β -ИФН гомологичны друг другу на 30%. Это указывает на то, что они дивергировали примерно 500 млн. лет назад, еще до появления позвоночных. Что же касается гена γ -ИФН, то он не имеет гомологии с генами других интерферонов, но кодирует белок сходного с ними размера, в котором отдельные аминокислоты занимают то же положение, что и в α - и β -интерферонах [50, 81].

Все гены интерферонов кодируют белки длиной 166 аминокислот с N-концевой сигнальной последовательностью длиной от 20 до 23 аминокислот, которая необходима потому, что интерфероны относятся к секретируемым белкам. В зрелых молекулах интерферонов эти сигнальные последовательности отсутствуют. Размер зрелых белков интерферона составляет 143, 145

и 146 аминокислот для соответственно α -ИФН, β -ИФН и γ -ИФН [211] (табл. 15.1).

5'-Некодирующие области некоторых генов α -ИФН гомологичны на 75%, но они сильно отличаются от соответствующих областей гена β -ИФН [211]. Ряд данных указывает на то, что эта область определяет экспрессию генов интерферонов [211]. Например, Вайсман и сотр. [186, 263] трансформировали L-клетки гибридным геном, в котором 5'-фланкирующая область человеческого гена $\alpha 1$ -ИФН была соединена с кроличьей β -глобиновой транскрипционной единицей. Правильно инициированная β -глобиновая РНК образовывалась только после индукции вирусом, причем ее образование характеризовалось той же кинетикой, что и при индукции интерфероновой мРНК. Фирс и сотр. [237] клонировали ген β -ИФН с промоторной областью и без нее в плазмидном векторе на основе SV40, которым трансфицировали клетки AP-8. При индукции, вызванной poly(IC), наблюдали 30-кратное увеличение синтеза интерферона; poly(IC) не действовал, если в плазмиду вставляли только кодирующую область гена β -ИФН. Делеционное картирование показало, что область между нуклеотидами 114 и 186 от места начала транскрипции регулирует экспрессию этого гена. Интересно, что эта область содержит последовательность, которая имеет заметное сходство с последовательностями областей, фланкирующих с 5'-конца гены, регулируемые стероидными гормонами.

Интерфероновые гены у других видов позвоночных

Для обнаружения интерфероновых генов у других видов животных в качестве зондов использовали гены интерферонов человека [270]. Все млекопитающие содержат сложные семейства генов α -ИФН, но только один или два гена β -ИФН, за исключением подсемейства бычьих, которые содержат мультигенное семейство β -ИФН, возникшее, вероятно, за счет серии недавних дупликаций гена. Позвоночные других классов содержат гены β -ИФН и не содержат генов α -ИФН.

Экспрессия клонированных генов интерферона

Интерфероновые гены клонированы в экспрессирующих векторах в бактериальных и дрожжевых клетках, в клетках насекомых и млекопитающих. В качестве промоторов использовали переносные промоторы Пташне и сотр. [235], промотор P_L фага λ [55], промотор полиэдрина [224a] и промотор *trp* [78, 278]. Интерфероны также экспрессировали в виде гибридного белка

с геном *lacZ* [224]. Таким образом экспрессировали не только клонированные, но и синтезированные гены интерферона; например, Танака и сотр. [233] химически синтезировали ген γ -ИФН, поместили его под контроль промотора *lac UV5* и обнаружили, что он экспрессируется в *E. coli*. Количества продуцируемого интерферона не очень велики; наилучший результат составляет примерно 10^9 ед. на 1 л. Интерферон, синтезирующийся в *E. coli*, частично процессируется: он не содержит сигнальной последовательности и не гликолизирован. По своей биологической активности он неотличим от соответствующего аутентичного интерферона.

Наиболее эффективно экспрессия клонированных генов интерферона происходит в дрожжевых клетках. Интерфероновые гены клонировали в челночных бактериально-дрожжевых векторах, в которых они находятся под контролем дрожжевого промотора *alcDI*. Дрожжевые клетки, трансформированные этой плазмидой, синтезируют до 10^6 молекул биологически активного интерферона на 1 клетку [98]. Недавно несколько генов α -ИФН и ген γ -ИФН были включены в плазмиды под контроль промотора 3-фосфоглицераткиназы, в результате чего были получены биологически активные интерфероны без сигнальной последовательности с выходом примерно 25 млн. ед. на 1 л [53].

Наконец, интерфероны экспрессированы в клетках млекопитающих, трансфицированных клонированными интерфероновыми генами. Среди использованных векторов были вирус бычьей папилломы [283], pSV2-neo [34, 56], и SV40- и dhfr-содержащие производные pKCR [94]. Трансфекция мышинных клеток L фрагментом человеческой ДНК размером 36 kb, содержащим ген β -ИФН, привела к временной экспрессии человеческого интерферона даже без экзогенной индукции [89]; при использовании в качестве индукторов двухцепочечной РНК и вируса ньюкаслской болезни экспрессия интерферона сильно увеличивалась. Интересно, что соседние гены также индуцировались, однако их индукция не была обязательной для синтеза интерферона. Транскрипция трансфицированных клонированных генов обычно усиливалась при заражении вирусом или после обработки poly(IC) (при условии, что клонированный участок содержит последовательности, фланкирующие ген с 5'-конца). Эти наблюдения подтверждают, что элементы, контролирующие индукцию, т. е. экспрессию генов интерферона, расположены в последовательностях, прилегающих к 5'-концу. Однако по некоторым данным ген β -ИФН человека, клонированный в плазмиде pBR322 под контролем промотора гена ТК HSV, конститутивно экспрессируется в мышинных клетках и отвечает на индукцию poly(IC) даже в отсутствие последовательностей, фланкирующих его с 5'-конца [184].

Выходы интерферона с клонированных генов, введенных в клетки млекопитающих невысоки; в лучшем случае они достигают 10^5 ед. на 1 мл в день, что значительно меньше количества, получаемого с собственными клеточными генами интерферона. Основным преимуществом при синтезе интерферона с клонированных генов является смена промоторов. В норме интерфероновые гены находятся под контролем элементов, которые могут быть включены только при помощи «деструктивных» индукторов: и вирусная инфекция, и poly(IC) обычно убивают клетки, поэтому интерферон может синтезироваться только в течение непродолжительного времени (обычно меньше, чем 48 ч). Однако, когда Хэйнес и Вайсман [94] ввели полученные ими dhfr-содержащие гибридные плазмиды в клетки СНО и вели селекцию в среде, содержащей метотрексат, им удалось выделить клоны, содержащие множественные копии плазмиды, которые продуцировали от 20 000 до 100 000 ед. интерферона на 1 мл в день конститутивно в течение нескольких месяцев. Создание линий клеток, продуцирующих интерферон конститутивно или при индукции недеструктивными воздействиями, следует считать большим достижением.

Создание и характеристика рекомбинантных генов человеческих интерферонов

Одной из наиболее интересных новых разработок является создание гибридных интерфероновых генов с использованием удобных общих участков расщепления рестриктазами. Таким способом могут быть получены многие гибридные интерфероны с определенными биологическими и фармакологическими свойствами. Интересно выяснить, можно ли улучшить в каких-либо отношениях природные гены интерферонов. Эта область только начинает развиваться, поскольку определение свойств рекомбинантных молекул интерферонов требует времени. К интересным для изучения свойствам интерферона относится его специфичность по отношению к мишени. Даже природные виды α -ИФН сильно различаются по этому признаку. Некоторые виды α -ИФН более активны в клетках человека по сравнению с клетками быка, другие наоборот; некоторые активны в клетках кролика, другие в той же степени активны в мышинных клетках [260]. Сейчас создано несколько гибридных генов α -ИФН человека [230, 262] и оказалось, что они сильно различаются по своей способности подавлять размножение разных вирусов в различных клетках и в организме разных животных [261]. Удалось идентифицировать отдельные аминокислотные остатки, от которых существенно зависит хозяйская специфичность интерферона [191].

На основе проведенных исследований может стать возможным создание рекомбинантных молекул гибридных интерферонов с заданными свойствами для применения в определенных ситуациях как в качестве противовирусных, так и противораковых препаратов.

Продукция интерферонов

Линии клеток, спонтанно продуцирующие интерферон

Обычно клетки не синтезируют интерферон. Все имеющиеся данные свидетельствуют о том, что это связано с отсутствием транскрипции интерфероновых генов, а не с быстрым распадом образующегося интерферона. Но в некоторых клетках гены интерферона транскрибируются спонтанно; связано ли это с постоянным присутствием в них какого-то индуктора или с перестройкой регуляторных областей интерфероновых генов, пока не ясно. Все известные до сих пор линии таких клеток относятся к лимфобластоидным [40]: некоторые из них продуцируют γ -ИФН [157, 163], но большая часть — α -ИФН в количествах, варьирующих от 100 до 1000 ед. на 1 мл [17, 182]. Интересно, что спонтанно продуцируемый интерферон однороден, т. е., по-видимому, представляет собой продукт единственного гена интерферона. Такие лимфобластоидные линии клеток можно также стимулировать к синтезу интерферона в больших количествах (см. ниже). Правда, образующийся при этом интерферон гетерогенен, т. е. является продуктом многих, если не всех, генов интерферонов, в том числе генов β -ИФН. Большая часть этих клеточных линий — Т-лимфоциты, и лишь немногие относятся к В-лимфоцитам.

Линии клеток, спонтанно образующие интерферон, представляют лишь теоретический интерес, поскольку количество продуцируемого ими интерферона слишком мало для того, чтобы его можно было использовать на практике. Во всех этих линиях, так же как и в клетках с полностью репрессированной в норме продукцией интерферона, эту продукцию можно derepressировать разнообразными агентами [215], которые подразделяются на несколько классов.

Агенты, индуцирующие интерферон

Вирусная инфекция

Первым и наиболее важным индуцирующим фактором интерферона служит вирусная инфекция. К выработке интерферона приводит заражение практически всеми вирусами, как

РНК-содержащими, так и ДНК-содержащими, причем РНК-содержащие вирусы — хорошие индукторы, тогда как ДНК-содержащие, за исключением поксвирусов, — более слабые. Кинетика образования интерферона примерно одинакова для всех вирусов: его синтез начинается примерно через 4 ч после заражения при 37°C, достигает пика, когда синтез вирусных белков происходит с максимальной скоростью, и затем снижается. Выходы интерферона сильно варьируют; хорошими считают выходы $\sim 10^3$ — 10^4 усл. ед. (NIH) на 10^6 клеток.

Чтобы определить, является ли индукция интерферона следствием какой-либо специфической вирусной функции, обычно использовали *ts*-(температурочувствительные) мутанты вируса. Например, Локарт и сотр. [146], а также Ломници и Берке [147] использовали *ts*-мутанты вируса Синдбис и вируса леса Семлики соответственно. Мутанты вируса Синдбис не вызывали образования интерферона независимо от того, были ли они РНК⁺ или РНК⁻. Мутанты вируса леса Семлики вели себя иначе. При низкой множественности РНК⁻-мутанты не индуцировали интерферон при непермиссивной температуре, в то время как РНК⁺-мутанты индуцировали интерферон в количествах, варьирующих от 5 до 75% от максимума, но количество синтезированного интерферона не коррелировало с уровнем синтеза РНК. При высокой множественности некоторые РНК⁻-мутанты продуцировали небольшое количество (до 15%) интерферона в отсутствие заметного синтеза РНК. Лаи и Йоклик [137] исследовали индукцию интерферона температурочувствительными мутантами реовируса. Используя мутанты, принадлежащие к шести рекомбинационным группам, они обнаружили, что все мутанты при пермиссивной температуре индуцировали примерно такое же количество интерферона, как и вирус дикого типа, но лишь от 1 до 17% — при непермиссивной. Мутанты с нарушением поздних этапов морфогенеза индуцировали не больше интерферона, чем мутанты с нарушением ранних этапов. Авторы сделали вывод, что индукция интерферона, вызываемая размножением реовируса, запускается каким-то событием, зависящим от образования зрелого потомства вирусных частиц. Вирус ньюкаслской болезни индуцирует интерферон только в том случае, если разрешена транскрипция РНК [129]. Требуется транскрипция всего 5% вирусного генома, причем неясно, нужна ли транскрипция определенного участка вирусного генома. И наконец, Джекобсен и сотр. [112] обнаружили, что вирулентные варианты вируса лимфоцитарного хориоменингита индуцируют образование интерферона, в то время как невирулентные не индуцируют. Молекулярную основу индукции синтеза интерферона вирусами еще предстоит открыть.

Двухцепочечная РНК

Ко второму типу индукторов интерферона относится двухцепочечная РНК. Лэмпсон и сотр. [139] обнаружили, что двухцепочечная РНК из разнообразных источников служит сильным индуктором интерферона как *in vivo*, так и *in vitro*. Индукторами интерферона оказались все природные двухцепочечные РНК, в том числе РНК реовирусов, вирусоподобных частиц грибов, репликативные формы РНК вирусов, содержащих одноцепочечную РНК (как вирусов позвоночных, так и бактериофагов), а также синтетические двухцепочечные полирибонуклеотиды, такие как poly (IC). Ни одноцепочечная РНК или ДНК, ни двухцепочечная ДНК, ни гибриды РНК—ДНК не способны служить индукторами интерферона. В качестве индукторов интерферона испытывали самые разные синтетические полирибонуклеотиды. Активные индукторы интерферона имеют следующие свойства: они обладают стабильной вторичной структурой, что видно по высокой устойчивости к нагреванию [poly (IC), например, — лучший индуктор, чем poly (AU)]; они относительно устойчивы к рибонуклеазам и имеют высокую молекулярную массу, причем наименьшая молекулярная масса активного индуктора соответствует длине в 100 остатков [62]. Устойчивость к рибонуклеазе коррелирует с увеличением способности индуцировать интерферон; например, устойчивое к рибонуклеазе тиофосфатное производное poly (AU) намного эффективнее в качестве индуктора интерферона, чем poly (AU), а активность poly (IC) значительно увеличивается при комплексовании с поликатионами, такими как ДЭАЭ-декстран, метилированный альбумин, протамин, полилизин или гистон [138]. Однако необходимо отметить, что конкретный признак двухцепочечного состояния РНК, ответственный за продукцию интерферона, пока неизвестен.

Инактивированные вирусы

К третьему основному классу индукторов интерферона относятся вирусы, не способные реплицироваться, такие, например, как вирусы в непермиссивных клетках или инактивированные вирусы. Примерами первых являются вирус ньюкаслской болезни в клетках L [57], реовирус у рыб [172] или в куриных клетках [281] и вирус синего языка овец у мышей [114]. Примерами вторых служат вирусы, убитые УФ-облучением, такие как вирус ньюкаслской болезни [280], вирус колорадской клещевой лихорадки [61], реовирус [137] и инактивированный нагреванием вирус гриппа, который был индуктором интерферона в первых опытах Айзекса и Линденмана [110]. При этом дело осложня-

ется, так же как и в случае других индукторов, огромной вариабельностью ответа, зависящего и от природы клеток, и от индуктора. Так, необлученный вирус ньюкаслской болезни индуцирует интерферон в мышинных, но не в куриных клетках, а облученный ультрафиолетом индуцирует интерферон в куриных, но не в мышинных клетках L. Вместе с тем облученный ультрафиолетом реовирус индуцирует интерферон в мышинных, но не в куриных клетках, тогда как инфекционный реовирус, неспособный реплицироваться в куриных клетках, индуцирует в них интерферон. Скорее всего эти различия отражают тот факт, что экспрессия интерфероновых генов, так же как и других эукариотических генов, не определяется принципом «все или ничего»; по-видимому, она подчиняется более сложным многокомпонентным механизмам, которые обладают обратной связью на нескольких уровнях (см. ниже).

Причина, по которой вирусы в непермиссивных клетках или инактивированные вирусы могут индуцировать интерферон, вероятно, заключается в том, что они содержат двухцепочечную РНК, способную из них высвободиться. По-видимому, именно поэтому в клетках грызунов инактивированный ультрафиолетом реовирус в 200 раз более эффективен как индуктор, чем неинактивированный, поскольку первый распадается в зараженной клетке с освобождением двухцепочечной РНК [96], тогда как во втором двухцепочечная РНК всегда находится в составе вирусных частиц, а не в свободном состоянии [79]. Кинетика индукции интерферона инфекционным реовирусом сходна с его индукцией другими вирусами: при 37°C синтез интерферона достигает максимума между 12 и 16 ч после заражения. В отличие от этого облученный ультрафиолетом реовирус индуцирует максимальную продукцию интерферона через 2—4 ч после заражения. Индукцию интерферона облученными ультрафиолетом или инактивированными прогреванием миксовирусами и парамиксовирусами объясняют следующим образом. Известно, что нормальные миксовирусы и парамиксовирусы содержат негативную РНК, но, по-видимому, некоторые вирусные частицы, количество которых не превышает 1—2%, содержат позитивную РНК, способную при высокой множественности заражения (которая используется при синтезе интерферона) гибридизоваться с негативной РНК. Образующаяся при этом в небольших количествах двухцепочечная РНК и действует как индуктор интерферона.

Представление о том, что индуктором интерферона при всех вирусных инфекциях (будь то инфекционный вирус в пермиссивных или непермиссивных системах или инактивированный или дефектный вирус) является двухцепочечная РНК, уже давно развивалось Маркусом и сотр. в серии исследований на мо-

дели вируса Синдбис [77], реовируса [271] и VSV [149]. В частности, они обнаружили, что дефектные интерферирующие (ДИ) частицы VSV, которые имеют частично deletированный геном, состоящий из фрагмента вирусной РНК, содержащего участки обеих поляриностей (негативные и позитивные), и, следовательно, потенциально способный образовать структуры типа «ручки сковороды» с высоким содержанием двухцепочечных участков, являются хорошими индукторами интерферона [148, 218]. Неясно, связана ли в действительности эта способность к частичному самоотжигу с индукцией интерферона, поскольку способность разных ДИ-частиц индуцировать интерферон не коррелирует с их потенциальным содержанием двухцепочечных участков [72].

Недавно был выявлен новый аспект индукции интерферона вирусами или их компонентами. Было обнаружено, что некоторые структурные вирусные белки, а именно белок фибрилл аденовируса [240] и гликопротеин HN вируса Сендай [111] обладают митогенной активностью для В-лимфоцитов и индуцируют образование интерферона в клетках селезенки. Значение этого наблюдения для феномена индукции интерферона в ходе вирусной инфекции еще предстоит выяснить.

Другие индукторы интерферона

Существуют и другие индукторы интерферона; большинство из них вызывает образование небольшого количества интерферона по непонятным причинам. Среди них бактериальные эндотоксины из *Brucella abortus* и *Listeria monocytogenes*, возбудители трахомы — конъюнктивита с включениями, микоплазмы, простейшие, риккетсии, такие синтетические полимеры, как сополимеры пирана, полимеры полиакриловой кислоты, малеиновая кислота — винилпирролидин, поливинилсульфат, такие полисахариды, как маннаны, декстрансульфат, сульфатированный полисахарид из морских водорослей и фосфоманнан [150]. Кроме того, существуют низкомолекулярные соединения, такие как тилерон, которые индуцируют интерферон у одних видов (мышей), но не у других (человека) [122]. Большая часть этих соединений является полианионами [150].

Метаболические активаторы (ингибиторы)

Еще одну важную группу индукторов интерферона составляют метаболические активаторы и ингибиторы. В первую подгруппу этих индукторов входят вещества, вызывающие образование γ -ИФН, а именно митогены для нестимулированных лимфоцитов и специфические антигены для иммунизированных

лимфоцитов [190]. В другую подгруппу метаболических активаторов, способных индуцировать любые интерфероны в разных клетках, входят промоторы опухолевого роста, в частности форболтетрадеканоацетат; сюда же относятся бутират, бромдезоксинуридин, дексаметазон и диметилсульфоксид [5, 6]. Все эти соединения стимулируют продукцию интерферона (до 50-кратной) в гемопоэтических клетках человека, клетках лимфомы, лейкоцитах [273], лимфобластоидных клетках (таких как клетки Намальва), фибробластах и др. Ретиноевая кислота подавляет образование α -ИФН человеческими лейкоцитами периферической крови в ответ на стимуляцию лектиновыми митогенами, вирусами, синтетическими полирибонуклеотидами и т. д. Эти наблюдения имеют значение для использования ретиноидов при лечении новообразований у человека [1, 5, 6].

Метаболические ингибиторы, в частности вещества, подавляющие образование мРНК или синтез белка, тоже способны индуцировать образование интерферона. Хорошо известен пример, когда при использовании таких веществ наблюдают «супериндукцию» — резкое увеличение количества интерферона, индуцируемого poly (IC). Механизм этого явления, наблюдаемого в человеческих клетках, но не в клетках грызунов, состоит в следующем [256]. Когда после одновременной обработки клеток poly (IC) и ингибитором синтеза белка циклогексимидом через 5 ч добавляют актиномицин D, а еще через 1 ч снимают блок синтеза белка, наблюдают в 50 раз более сильное образование интерферона, чем в отсутствие циклогексимиды. В основе этого явления лежит существование лабильного регулятора экспрессии интерфероновых генов. Полагают, что в течение первых 5 ч накапливаются мРНК, кодирующие как интерферон, так и регулятор. Добавление актиномицина D приводит к тому, что обе мРНК истощаются, причем мРНК регулятора истощается быстрее, чем мРНК интерферона. После снятия блока синтеза белка образуется только интерферон при резко сниженной концентрации регулятора. Предпринимались попытки (в частности, Сегалом и сотр.) получить доказательства такого объяснения путем измерения количеств мРНК для интерферона в разные сроки в ходе этого опыта. Полученные результаты не противоречили этим представлениям, но, правда, и не доказали их правильность [212, 214, 215]. Значение этой модели состоит в том, что в ней предполагается подавление экспрессии гена интерферона репрессорами, действующими, вероятно, на предшествующие гену интерферона нуклеотидные последовательности. Поскольку эти последовательности для генов α -ИФН, β -ИФН и γ -ИФН [211] различны, неудивительно, что разные индукторы вызывают синтез разных видов интерферона. Можно привести два примера. Лимфобластоидные клетки обычно

продуцируют спонтанно α -ИФН или γ -ИФН, но при индукции продуцируют также и β -ИФН [6, 7, 157, 273], а фибробласты человека продуцируют α -ИФН и β -ИФН в ответ на вирусную инфекцию, но только β -ИФН в ответ на poly (IC) [177].

Наконец, значительный интерес представляет вопрос, происходит ли при индукции интерферона синтез других белков, например при действии poly (IC) на человеческие фибробласты. Для того чтобы ответить на этот вопрос, мРНК, выделенную из индуцированных клеток, транслировали в бесклеточной белок-синтезирующей системе [187]. В подобных опытах было обнаружено, что синтезируется не только β -интерферон, но и 23 других белка, которые при использовании мРНК из неиндуцированных клеток не синтезируются. Таким образом, механизмами, чувствительными к poly (IC), регулируется экспрессия не только генов интерферона, но и других генов. То же самое, вероятно, справедливо и в случае вирусной инфекции. При заражении литическими вирусами подавляется белковый синтез. Весьма вероятно, что синтез одних белков более чувствителен к подавлению, чем синтез других, и если среди чувствительных белков имеются репрессоры, то будет происходить дерепрессия. Дерепрессия возможна также в том случае, когда период полужизни репрессора короче, чем период полужизни белков, синтез которых они контролируют, причем есть данные, подтверждающие это положение.

Праймирование

Праймирование — это очень интересный феномен, связанный с продукцией интерферона [109]. Суть его можно сформулировать следующим образом: клетки, обработанные низкими дозами интерферона (0,5 ед. интерферона на 1 мл), образуют больше интерферона, чем не обработанные. Праймированные клетки синтезируют интерфероновые мРНК в ответ на обработку poly(IC) раньше, чем непраймированные, и часто в больших количествах [4, 76]. Однако при блокировании синтеза белка синтез мРНК происходит обычным образом. В праймированных клетках стабильность интерфероновой мРНК не увеличивается, но, по-видимому, она более эффективно транслируется. Праймирование широко используют для увеличения выхода при крупномасштабном производстве α -ИФН и β -ИФН [91, 245].

Интерфероновые мРНК

Пятнадцать лет назад интерфероновые мРНК были изучены лучше, чем сами интерфероны или их гены. В настоящее время интерфероновые гены клонированы и секвенированы, а

многие интерфероны полностью очищены (см. ниже). Размер молекул интерфероновой мРНК легко определяют электрофорезом в полиакриламидном геле, а ее количество измеряют путем трансляции либо в ооцитах *Xenopus*, либо в бесклеточной белоксинтезирующей системе [177, 265]. Интересно, что при добавлении микросом поджелудочной железы собаки к обработанному микрококковой нуклеазой лизату ретикулоцитов кролика выход β -интерферона при трансляции его мРНК увеличивается в 50 раз [142]. Как полагают, это связано с более эффективным отщеплением сигнального пептида (см. выше).

Количественные определения интерфероновой мРНК проводили с целью исследования механизма индукции интерферона и кинетики его синтеза [63, 188]. Например, когда кинетику транскрипции и деградации мРНК β -ИФН в фибробластах анализировали путем трансляции в ооцитах *Xenopus* и гибридизации с клонированной кДНК, обнаружили, что мРНК исчезала через 4 ч после появления. Выяснили также, что деградация требует непрерывного синтеза белка, что на ранних стадиях мРНК имеет длину 1100 нуклеотидов и что впоследствии ее размер постепенно уменьшается [188].

Интересно отметить, что существует несколько видов мРНК человека, кодирующих β -ИФН. Поскольку геном человека содержит ограниченное число генов β -ИФН, значение этой множественности видов мРНК неясно [211, 265].

Очистка

Многие интерфероны были в последнее время успешно очищены. Наиболее эффективные этапы очистки включают хроматографию на голубой сефарозе и веществах, хелатирующих Cu и Zn [21, 127], адсорбционную хроматографию на пористом стекле [116, 267, 279] и иммуноаффинную хроматографию с использованием как поликлональных, так и моноклональных антител [30, 170]. Процедуры очистки с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН позволяют одновременно получать интерфероны разных классов [99].

Удельная активность большинства чистых интерферонов составляет $\sim 5 \cdot 10^8$ международных ед. на 1 мг. В оптимальных условиях выход может достигать 20—40%, а фактор очистки 350 000.

Недавно один из интерферонов (рекомбинантный α -ИФН) был закристаллизован [153]. В настоящее время проводят исследования его третичной структуры.

Антитела против интерферонов

Современную технологию получения антител против интерферона применяют в двух вариантах. Во-первых, во многих лабораториях получены моноклональные антитела против различных интерферонов [100, 158, 210, 226], которые используют в очистке и анализе интерферонов, а также для характеристики индивидуальных видов интерферонов [108]. Во-вторых, с помощью химически синтезированных интерфероновых пептидов получены сыворотки против интерферонов. Например, химически синтезированный пептид β -ИФН (остатки 1-13) [219], конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином, использовали для получения специфической антисыворотки против β -ИФН, что позволило разработать очень чувствительный радиоиммуноанализ (см. также [165]).

Различные биологические эффекты интерферонов

Для интерферонов характерны многочисленные и разнообразные биологические эффекты. Среди них антивирусная активность и способность подавлять размножение клеток, в том числе опухолевых, иммуномодуляция, подавление некоторых клеточных синтезов и усиление других, изменение клеточных мембран, увеличение токсичности и др. [255]. Многие из этих активностей впервые наблюдали на неочищенных препаратах различных интерферонов; лишь некоторые из них были заново исследованы с чистыми индивидуальными препаратами интерферона. Тем не менее большая часть из перечисленных действий, вероятно, обусловлена собственно интерфероном. Сложность состоит в том, что ранее, да и теперь, эффекты интерферона в различных лабораториях исследуют в разных условиях, так что их сравнение затруднительно. Ниже мы сосредоточим внимание на подробно изученных эффектах или на эффектах, заслуживающих детального исследования в будущем.

Интерфероновые рецепторы

Действие интерферонов, как и гормонов, осуществляется на плазматической мембране клетки при их соединении с особыми рецепторами [73, 130, 131]. В двух ключевых опытах было четко показано, что интерферон не обладает биологической активностью внутри клетки, в которой он образуется. Прежде всего он должен быть секретирован, а затем вновь адсорбирован клетками [252] (поэтому при микроинъекции интерферон не способен индуцировать антивирусное состояние [106]). В этих

опытах было также доказано, что интерферон, прикрепленный к поддерживающей поверхности, например к шарикам сефарозы, обладает биологической активностью. Сначала, вероятно, интерферон неспецифически связывается с ганглиозидами [20, 22, 134] аналогично гликопротеиновым гормонам или холерному токсину. Затем он, по-видимому, переносится на специфический рецептор, природа которого в случае γ -ИФН неясна. В случае α -ИФН и β -ИФН рецептор представляет собой гликопротеин, который у человека кодируется геном, расположенным в хромосоме 21 [31, 65, 120]. О связи между геном рецептора и хромосомой 21 свидетельствует тот факт, что клетки с трисомией по хромосоме 21 связывают больше, а с моносомией — меньше интерферона, чем диплоидные клетки [32, 272]. Этот гликопротеин, к которому интерферон может быть ковалентно пришит, образует некооперативные участки связывания, которые расположены в основном в покрытых клатрином зонах и углублениях [134, 135]. Комплексы интерферона с рецептором подвергаются диффузии и агрегации на поверхности клетки, а затем эндоцитозу, который происходит через 1—2 ч [9, 10]. Вероятно, в результате попадания комплексов внутрь клетки в ядре запускаются какие-то процессы, которые ведут к установлению антивирусного состояния и определяют разнообразные действия на метаболизм. Интерферон, попавший внутрь клетки, быстро разрушается [12]. Интерферон, оказавшийся в клетке в свободном состоянии (без рецептора), не обладает специфической функциональной активностью.

Антивирусная активность интерферонов

Интерферон был открыт вирусологами, искавшими фактор, ответственный за придание клеткам устойчивости к вирусам. И хотя впоследствии было обнаружено, что интерферон обладает способностью регулировать активность и функции клеток, это не ослабило значения его антивирусной активности. Затем неоднократно было показано, что у животных, которым была введена антисыворотка против интерферона, вирусная инфекция протекает гораздо тяжелее, чем у животных, которым сыворотка не вводилась. Таким образом, почти нет сомнений в том, что интерферон составляет первую линию обороны против вируса, действующую еще до того, как иммунные механизмы оказываются полностью мобилизованными.

В этой связи очень интересен и важен вопрос о том, защищает ли интерферон клетку от действия вирусной инфекции, или он просто делает эту инфекцию абортивной (см. ниже). Очевидно, исход зависит от конкретной системы. В случае L-клеток, зараженных вирусом осповакцины, синтез белков хозяйской

клетки подавляется быстрее в клетках, обработанных интерфероном, чем в необработанных; в них происходят выраженные цитотоксические изменения, и они погибают (см. ниже) [119]. Однако в других системах картина может быть иной. Во многих системах клетки, обработанные интерфероном, защищены от вирусной инфекции, так что они выживают гораздо чаще, чем необработанные [217]. Защита зависит от концентрации интерферона и множественности заражения: большие дозы интерферона защищают при низкой множественности заражения, но при высокой множественности защитное действие интерферона преодолевается [160]. В нормальных условиях в организме интерферон, без всякого сомнения, защищает многие клетки от цитопатического действия вирусной инфекции (т. е. «сохраняет» их), но не ликвидирует полностью вирусную инфекцию. Таким образом, интерферон может играть свою роль в установлении и поддержании персистентной вирусной инфекции. Другими факторами, влияющими на эти процессы, являются присутствие антител в низких концентрациях, наличие дефектных интерферирующих (ДИ) частиц и появление штаммов вируса со сниженной вирулентностью.

Огромные усилия были затрачены на выяснение механизмов, с помощью которых интерфероны подавляют размножение вирусов. Было показано, что интерфероны не прямо влияют на этот процесс, а индуцируют синтез клеточных белков, которые являются действительными эффекторами антивирусного состояния; именно поэтому интерфероны не проявляют антивирусную активность, если подавлен синтез мРНК или синтез белков. Антивирусное состояние обычно сохраняется несколько дней и затем пропадает. Через несколько дней антивирусное состояние может быть вновь индуцировано.

Ясно, что при индуцированном интерфероном подавлении размножения вируса нарушается способность вирионных или ранних вирус-специфических мРНК транслироваться. В результате не синтезируются вирус-специфические белки, не образуются новые вирусные геномы и инфекция прерывается. Первые указания на то, что именно эти события лежат в основе антивирусного действия интерферона, были получены в опытах Йоклика и Меригана [119] с L-клетками, зараженными вирусом осповакцины. Когда эти клетки обрабатывали интерфероном, наблюдалось быстрое и практически полное разрушение полисом и параллельное подавление белкового синтеза. В необработанных клетках заражение вирусом осповакцины также приводит к диссоциации полисом хозяйской клетки, но после этого вирусные мРНК связываются с освобождающимися рибосомами с образованием вирус-специфических полисом, синтезирующих вирусные белки. В клетках, обработанных интерфероном, этого не

происходит. Хотя мРНК вируса осповакцины образуются в таких клетках с нормальной или даже повышенной скоростью, эти мРНК не связываются с рибосомами и вирус-специфические полисомы не образуются. В результате вирусные белки не синтезируются и размножение вируса прекращается или подавляется.

Такая картина подавления характерна и для других вирусов, в том числе пикорнавирусов, тогавирусов, рабдовирусов, миксовирусов, парамиксовирусов, герпесвирусов и паповавирусов. В некоторых системах трудно определить, что подавляется в большей степени — транскрипция или трансляция. В случае вируса осповакцины ответ ясен — это трансляция [119]; такой же результат был получен с реовирусом [268]. В других системах вирус — клетка, в частности в клетках, зараженных VSV или SV40, сначала казалось, что подавляется скорее транскрипция, чем трансляция. Однако, когда определяли только первичную транскрипцию в отсутствие синтеза вирусных белков и не использовали метаболические ингибиторы, которые вызывают артефактные эффекты, было обнаружено, что в клетках, зараженных VSV, первичным действием обработки интерфероном также является подавление трансляции мРНК, транскрибированной с родительского генома [192]. Если клетки заражали ДНК SV40, а не самим вирусом, то трансляция ранних вирусных мРНК подавлялась намного сильнее, чем транскрипция [276]; если интерферон добавляли к клеткам на поздних стадиях литического цикла SV40, то скорость транскрипции мРНК не снижалась, а трансляция мРНК подавлялась [274]. Эти результаты привели к предположению, что интерферон подавляет связывание, проникновение и раздевание SV40. Недавно получено доказательство, что интерферон действительно ингибирует связывание и проникновение вируса [266]. При этом обнаружено, что предварительная обработка L-клеток интерфероном подавляет проникновение VSV, не нарушая адсорбции.

За исследованиями *in vivo* вскоре последовали попытки воспроизвести индуцированное интерфероном подавление трансляции вирусных мРНК *in vitro*. Основной схемой этих опытов было получение бесклеточных белоксинтезирующих систем из необработанных и обработанных интерфероном клеток и исследование их способности транслировать различные клеточные и вирусные мРНК. Самуэль и Йоклик [206] использовали клетки Кребс II, обработанные в форме асцита интерфероном, и обнаружили, что в то время как в экстрактах из необработанных и обработанных интерфероном клеток синтетические мРНК [например, poly(U)] и клеточные мРНК транслировались одинаково хорошо, в экстрактах из обработанных интерфероном клеток вирусные мРНК (например, мРНК реовируса или вируса осповакцины) транслировались значительно хуже. В опытах по сме-

шиванию экстрактов удалось показать, что это обусловлено присутствием ингибитора, а не недостатком какого-то необходимого фактора. Ингибитор не обладает видоспецифичностью, связан с рибосомами и может быть отделен от них промыванием KCl [205].

В других системах избирательность трансляции оказалась выраженной в незначительной степени. Экстракты из клеток, обработанных интерфероном, были не способны транслировать не только вирусные, но и клеточные мРНК. Даже в зараженных SV40 клетках BSC1, обработанных интерфероном, когда в интактных клетках подавляется только синтез вирусного, а не клеточного белка, после разрушения клеток избирательность утрачивается, и экстракты из обработанных интерфероном клеток не транслируют ни вирусные, ни клеточные мРНК [193, 194]. Молекулярная основа пониженной способности транслировать клеточные мРНК неизвестна.

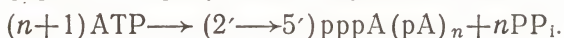
На этом этапе были сделаны два наблюдения, которые открыли совершенно новые подходы. Одним из них было обнаружение Керром и сотр. [124, 125] ингибитора трансляции в экстрактах из обработанных интерфероном клеток и его идентификация как 2,5-oligo(A); другим было выявление фосфорилирования по крайней мере двух белков только в обработанных интерфероном клетках. В обоих случаях интерферон индуцировал синтез ферментов, которые полностью отсутствовали в необработанных клетках. Тот факт, что интерферон индуцирует антивирусное состояние только в том случае, если разрешен синтез мРНК и белков, конечно, был известен давно; предпринимались попытки идентифицировать эти белки при помощи одноили двумерного электрофореза [88, 201]. Однако, хотя было показано, что после обработки интерфероном образуется несколько новых полипептидов, ни один из них не удалось идентифицировать. Таким образом, под действием интерферона возникают две новые ферментативные активности.

Система 2,5-oligo (A)

В 1974 г. Керр и сотр. [125] обнаружили, что при заражении вирусом усиливается вызываемое интерфероном нарушение трансляции, и предположили, что за это ответственна двухцепочечная РНК, образующаяся при репликации вируса. Было известно, что подавление белкового синтеза в ретикулоцитных лизатах под действием двухцепочечной РНК происходит из-за нарушения инициации, а также то, что двухцепочечная РНК является не только индуктором интерферона, но и активатором цитотоксического действия инфекции в обработанных интерфероном клетках. Это подтверждало представление о том, что двух-

цепочечная РНК является кофактором в антивирусном действии интерферона.

Керр и сотр. подробно изучили усиление подавляющего действия двухцепочечной РНК на трансляцию в цитоплазматических экстрактах и в рибосомной системе. В серии очень тонких опытов они сумели выделить низкомолекулярный термостабильный ингибитор, который был идентифицирован как семейство олигомеров с общей структурой $(2' \rightarrow 5')\text{pppA}(\text{pA})_n$, где n варьирует от 1 до примерно 15, причем преобладает гомолог с $n=2$ [124, 198]. Показано, что этот набор олигоаденилатов синтезируется ферментом олигоизоаденилатсинтетазой [189, 225, 282], образование которого индуцируется интерфероном [102, 124, 132, 277] до 50—100-кратного уровня. Реакция, которую катализирует этот фермент в присутствии двухцепочечной РНК, такова:



Равновесие реакции сильно сдвинуто в сторону синтеза. Вследствие необычной фосфодиэфирной связи между $2'$ - и $5'$ -гидроксильными $(2' \rightarrow 5')\text{pppA}(\text{pA})_n$, называемый обычно 2,5-oligo(A), устойчив к обычным нуклеазам. Однако он разрушается до АТР и АМР в экстрактах различных клеток под действием $2' \rightarrow 5'$ -фосфодиэстеразы, расщепляющей фосфодиэфирные связи $2' \rightarrow 5'$ эффективнее, чем связи $3' \rightarrow 5'$ [209].

2,5-oligo(A) активирует рибонуклеазу (РНКаза) L, которая присутствует в латентной форме в цитоплазме клеток млекопитающих [223]. РНКаза L очищена и хорошо охарактеризована. Обычно ее уровень не увеличивается при обработке клеток интерфероном, хотя имеются и исключения [113]. Ее мол. масса $\cong 185\,000$. Она сильно, но обратимо связывает 2,5-oligo(A) и по своему действию является 2,5-oligo(A)-связывающим белком [168]. РНКаза L чаще всего расщепляет РНК после UA, UG и UU и намного реже после CA и AC. Единственный расщепляемый ею гомополимер — poly(U) [70]. Что касается структуры активаторов, то они должны обязательно содержать $5'$ -ppp и свободные ОН-группы на $2'$ -конце [59], а замена А на любое из других оснований ведет к потере активности.

Открытие системы 2,5-oligo(A) вызвало большой интерес: действительно, обработка интерфероном индуцирует образование фермента, синтезирующего активатор латентной нуклеазы, которая может в свою очередь расщеплять вирусные мРНК и таким образом подавлять синтез вирусных белков [33, 143]. Однако пока лишь строят догадки относительно значения этого механизма для подавления размножения вирусов. Во-первых, неясно, как обеспечивается специфичность и избирательность. Нет убедительных доказательств того, что РНКаза L разрушает вирусные мРНК быстрее, чем клеточные [167, 189]. Во-вторых,

источник двухцепочечной РНК для активации 2,5-oligo(A)-синтетазы неизвестен. Часто считают, что реовирусы, содержащие двухцепочечную РНК, представляют собой хорошие индукторы интерферона. Однако двухцепочечная РНК реовируса никогда не присутствует в цитоплазме зараженных частиц в свободном виде; она всегда находится внутри вирусной частицы [79]. Подобно этому, репликативные формы РНК-вирусов с негативным геномом также не «голые», а всегда заключены в устойчивые к нуклеазам нуклеокапсиды. Что касается клеток, зараженных ДНК-содержащими вирусами, то действительно из таких клеток (как и из незараженных) можно выделить двухцепочечную РНК; тем не менее такая РНК обнаруживается в экстрагированном из клеток материале только после инкубации в условиях отжига. Скорее всего она представляет собой либо продукт гибридизации редких транскриптов, образовавшихся в результате проскока терминаторов у расположенных рядом генов, транскрибирующихся в противоположных направлениях, либо короткую шпильку в нормальных транскриптах. Ни в одном из этих случаев нет уверенности в том, что такая двухцепочечная конфигурация РНК имеется в клетке. Единственными частично двухцепочечными структурами, которые находят в зараженных вирусами клетках млекопитающих, являются «голые» репликативные промежуточные формы РНК-содержащих вирусов с позитивным геномом (пикорнавирусов, калицивирусов, тогавирусов и коронавирусов). Поэтому описанный выше механизм подавления синтеза белков применим лишь к этим вирусам [167]. Однако следует отметить, что конкретные характеристики двухцепочечного состояния РНК, необходимые для активации 2,5-oligo(A)-синтетазы, неизвестны, и не исключено, что природным активатором синтеза 2,5-oligo(A) окажется не двухцепочечная РНК, а какое-либо другое соединение. В-третьих, описано множество систем, в которых не наблюдается корреляции между установлением антивирусного состояния и уровнем 2,5-oligo(A)-синтетазы. Например, в клетках K/Balb очень высокий эндогенный уровень активности синтетазы, но они не обладают устойчивостью к вирусной инфекции. После обработки интерфероном уровень синтетазы в них не меняется, однако более чем в 100 раз увеличивается активность протеинкиназы [103]. Известно также, что в диплоидных фибробластах человека MRC5 антивирусное состояние развивается в отсутствие обнаруживаемого уровня синтетазы [152].

Интерфероны разных классов различаются по способности индуцировать синтетазу в разных клетках [14, 33, 193, 194, 254]. Например, в клетках HeLa β -ИФН не индуцирует фермент, а α -ИФН индуцирует. Неудивительно поэтому, что α -ИФН способствует их переходу в антивирусное состояние, а β -ИФН не способствует.

В серии опытов попытались определить, действительно ли вирусная мРНК деградирует быстрее в клетках, обработанных интерфероном, по сравнению с контрольными необработанными клетками. Полученные до сих пор результаты в основном отрицательны. В клетках, обработанных интерфероном и зараженных менговирусом, не обнаружено заметной деградации вирусной мРНК [251], а мРНК для Т-антигена SV40 не менее стабильна в клетках, обработанных интерфероном, по сравнению с необработанными [46]; то же самое справедливо и для мРНК вируса осповакцины и реовируса [155]. Однако недавно появились довольно странные сообщения о том, что в клетках, обработанных интерфероном, подвергается деградации рибосомная РНК [166, 208, 221].

Индукция интерферонами протеинкиназы

Второй механизм, объясняющий антивирусную активность интерферона, включает индукцию протеинкиназы, которая фосфорилирует несколько белков в зараженной клетке, в частности белок, называемый по молекулярной массе белком 67К или 72К, и малую (α) субъединицу фактора инициации eIF2 [156, 196]. Подобно 2,5-oligo(A)-синтетазе, активность этой протеинкиназы усиливается в клетках, обработанных интерфероном, в которых ее уровень часто увеличивается более чем в 20 раз; ее присутствие может быть также показано в экстрактах клеток, обработанных интерфероном, в которых она активируется двухцепочечной РНК [142]. Обстоятельства, которые сопутствуют синтезу и индукции этого фермента в клетках, обработанных интерфероном, и его активации *in vivo* и *in vitro*, очень сходны с таковыми для 2,5-oligo(A)-синтетазы [33, 87, 155, 166, 171, 198, 208, 282].

Последствия фосфорилирования белка 67К (или 72К) неизвестны, однако эффект фосфорилирования малой субъединицы eIF2 очевиден. Информация по этому поводу исходит из другой области исследований. Давно известно, что гемин контролирует синтез глобина. В отсутствие гемина активируется протеинкиназа, которая фосфорилирует и тем самым инактивирует малую субъединицу eIF2 [144]. Протеинкиназа, синтез которой активируется интерфероном, очень сходна, а может быть, даже идентична протеинкиназе, которая активируется или дерепрессируется в отсутствие гемина [204]. Таким образом в результате фосфорилирования малой субъединицы eIF2 инактивируется способность этого фактора участвовать в белковом синтезе. Действительно, добавление eIF2 к клеточному экстракту снимает вызванный интерфероном блок трансляции вирусной мРНК [121].

Вопросы, возникающие при подобном объяснении механизма

антивирусного действия интерферона, аналогичны тем, которые были перечислены в связи с синтетазой; они касаются избирательности, происхождения двухцепочечной РНК и объяснения исключений, встречающихся наряду с обычно существующей корреляцией антивирусного состояния и индукции протеинкиназы [208]. Например, в клетках человека интерфероны индуцируют синтез киназы и появление антивирусного состояния против VSV, но не против реовируса [207]; в клетках обезьяны они индуцируют протеинкиназу и антивирусное состояние против реовируса, но не против SV40 [208]. Далее, в некоторых линиях фибробластов человека α -ИФН и β -ИФН индуцируют антивирусное состояние и синтез 2,5-oligo(A)-синтетазы, но не индуцируют протеинкиназу [101]. Эти примеры относятся к исключениям, но они показывают, что индукция протеинкиназы не всегда ведет к установлению антивирусного состояния. Используя другой подход, Бальони и сотр. [15] изучили требования к структуре двухцепочечного полирибонуклеотида для активации синтетазы или протеинкиназы и индукции антивирусного состояния. Они обнаружили, что хорошие индукторы интерферона активируют оба фермента, в то время как плохие не активируют ни одного. Однако некоторые полинуклеотиды, будучи хорошими индукторами интерферона и активаторами киназы, не стимулируют синтетазу; другие не индуцируют антивирусное состояние и не активируют синтетазу, но активируют киназу; а один полинуклеотид является активным индуктором антивирусного состояния, но не активирует ни киназу, ни синтетазу. В сходном исследовании, в котором сравнивали действие 2'-О-метилированных производных poly(IC), обнаружили, что полностью метилированные производные не способны активировать ни киназу, ни синтетазу, а частично метилированные полинуклеотиды стимулируют их специфическим образом, активируя протеинкиназу в условиях, когда не активируется синтетаза [154].

Суммируя, можно отметить, что хотя при установлении антивирусного состояния уровни и 2,5-oligo(A)-синтетазы, и протеинкиназы часто сильно возрастают, пока нет четкой картины происходящих при этом событий. В настоящее время вопрос о механизме, участвующем в специфическом подавлении размножения вируса, вызванном обработкой интерфероном, остается открытым.

Другие факторы, которые могут быть вовлечены в установление антивирусного состояния

Исследовалась также возможная роль других факторов в установлении антивирусного состояния. Один из них обсуждается в течение многих лет, правда, для него не показана определен-

ная связь с антивирусным состоянием; мы имеем в виду метилирование. Например, мРНК VSV, синтезирующиеся в обработанных интерфероном клетках HeLa, обычно кэпированы, но не метилированы и не связываются с полисомами [49]. В этих клетках увеличены концентрации как S-аденозилметионина, так и S-аденозилгомоцистеина, причем последнего больше, чем первого; предполагают, что увеличение концентрации S-аденозилгомоцистеина может быть причиной подавления метилирования, а это в свою очередь может предотвращать трансляцию. Есть сообщение, что 2,5-oligo(A) ингибирует мРНК-G7-метилтрансферазу, а некоторые из производных этого олигонуклеотида еще более активны [80].

Наконец, многочисленные исследования показали, что обработка интерфероном индуцирует изменения в плазматической мембране клеток. Доказательства этого утверждения сводятся к следующему. Во-первых, предварительная обработка L-клеток мышинным интерфероном подавляет проникновение VSV в клетки, не влияя на адсорбцию [266]. Во-вторых, и α -ИФН, и β -ИФН подавляют слияние клеток, вызываемое вирусом Сендай [37, 242] и вирусом саркомы мышей Молони [3], вероятно, за счет увеличения жесткости мембраны. В-третьих VSV, который в небольших количествах выходит из клеток, обработанных интерфероном, дефицитен по белку М и гликопротеину поверхностных выступов G [115]. Это свидетельствует о подавлении сборки вируса. В-четвертых, подавление размножения ретровирусов в клетках, обработанных интерфероном, вероятно, обусловлено его влиянием на плазматическую мембрану (см. ниже).

Влияние интерферона на размножение опухолеродных вирусов и трансформацию клеток

Подробно изучено действие интерферона на размножение опухолеродных вирусов, на их способность трансформировать клетки и на способность интегрированного генома опухолеродных вирусов экспрессироваться в трансформированных клетках. Больше всего работ выполнено с ДНК-содержащим опухолеродным вирусом SV40 (см. выше). Когда клетки предварительно обрабатывают интерфероном, эффективность их трансформации значительно снижается [175, 241]. Причина этого до сих пор не ясна. Показано также, что интерферон избирательно влияет на экспрессию ранних генов в зависимости от того, интегрирована вирусная ДНК или нет; так, трансформированные SV40 клетки могут пассироваться в присутствии интерферона на протяжении многих генераций без какого-либо изменения синтеза Т-анти-

гена (ранняя функция), в то время как в литически зараженных клетках интерферон подавляет образование Т-антигена [159, 176]. Литический цикл размножения вируса SV40 оказался также примечательным тем, что репликация вирусной РНК и трансляция мРНК чувствительны к интерферону даже при внесении его через несколько часов после заражения [275]. В большинстве других систем для того чтобы проявился эффект интерферона, антивирусное состояние должно установиться до начала заражения, а добавление интерферона после заражения не оказывает заметного влияния на выход вируса.

Что касается ретровирусов, то несколько групп исследователей сообщают, что интерферон подавляет трансформацию мышинных клеток такими ретровирусами, как KiSV и RSV [13, 231]. По-видимому, интерферон действует до интеграции; он предотвращает либо синтез, либо интеграцию провирусной ДНК [13]. Недавно обнаружено, что интерферон ингибирует даже трансформацию мышинных клеток экзогенными клеточными и вирусными генами [60]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого действия, неизвестны.

Интерферон подавляет размножение ретровирусов как в экзогенно или хронически зараженных клетках, так и в трансформированных клетках, но механизм этого подавления сильно отличается от того, с помощью которого интерферон подавляет размножение литических вирусов. В любом случае обработка интерфероном значительно снижает число образующихся вирусных частиц, а удельная инфекционность частиц значительно меньше, чем у вируса, освобождающегося из необработанных клеток [2, 281]. Меньшая удельная инфекционность обычно, хотя и не всегда, связана с присутствием дефицитного по фукозе гликопротеина с мол. массой 85 000 (gp85), который, по-видимому, представляет собой предшественник нормального главного гликопротеина внешней оболочки gp69/71 [23], а также с небольшими и пока необъясненными изменениями в составе вирусных частиц. Обычно снижение выхода вирусных частиц происходит параллельно с увеличением числа вирусных частиц, остающихся связанными с клеточной мембраной на каких-то промежуточных стадиях процесса почкования. В данном случае синтезируется нормальное количество вирусной РНК и белков [35, 195], однако в некоторых системах наблюдается неправильное расщепление новосинтезированной полипептидной цепи, например в культуре фибробластов утки, зараженных вирусом птичьей саркомы B77. В этой культуре при осаждении моноспецифическими антисыворотками обнаруживается более чем 5-кратное увеличение количества нового белка, который осаждается антисывороткой против обратной транскриптазы, и очень значительное снижение количества комплекса Pr76-gp85, являющегося промежу-

точным продуктом морфогенеза ретровирусов [281]. Таким образом, интерферон подавляет размножение ретровирусов, ингибируя довольно поздние стадии морфогенеза, предположительно оказывая действие на плазматическую мембрану клетки [162]. В этой связи заслуживает упоминания тот факт, что быстрое образование синцитиев, индуцированное вирусом саркомы мышей Молони, значительно подавляется интерфероном.

Как было обнаружено во многих работах, индуцированное интерфероном подавление размножения ретровирусов не всегда коррелирует с индукцией антивирусного состояния против литических вирусов [11]. Например, обработка хронически зараженных вирусом RD-114 клеток α -ИФН или β -ИФН приводит к подавлению размножения ретровируса, но репликация VSV или вируса EMC устойчива к интерферону в этих клетках [97], что коррелирует с отсутствием образования киназы и синтетазы [244]. Исследовано влияние интерферона на образование вируса лейкоза мышей Молони в двух клонах клеток мышей Swiss. Образование этого вируса подавлялось в одинаковой степени, хотя один клон был значительно чувствительнее к интерферону, чем другой, когда индукцию антивирусного состояния измеряли по степени подавления репликации вируса EMC [45]. Судя по подавлению размножения вируса MoLV, клетки NIH/3T3 очень чувствительны к интерферону, но, судя по подавлению репликации вируса EMC, они устойчивы к нему. В отличие от этого в клетках A204 как репликация ретровируса M7 и вызываемое им слияние клеток, так и размножение вируса EMC и VSV очень чувствительны к интерферону [244].

Антипролиферативная активность интерферонов

Помимо антивирусной активности для интерферонов характерны также эффекты, отражающие их влияние на разнообразные клеточные функции [18] (табл. 15.2). Эти эффекты могут быть разделены на две группы. Первая включает подавление роста как нормальных, так и опухолевых клеток и влияние на дифференцировку, в том числе усиление и подавление синтеза определенных белков. Вторая группа включает влияние на иммунную систему: усиление активности природных киллеров у лимфоцитов человека, усиление антителозависимой клеточной цитотоксичности, ингибирование антиген- и митоген-индуцированного подавления миграции лейкоцитов и усиление экспрессии антигенов гистосовместимости и β -микроглобулина. Эти влияния исследовали во многих системах, но подробно было изучено лишь небольшое число систем.

Таблица 15.2. Влияние интерферонов на функции клеток

Действие	Необходимая доза (PRD ₅₀ /мл)	Примечание
Подавление клеточного роста	0,2—1000	Большая часть клеток чувствительна, но их чувствительность сильно варьирует. Клетки опухолей несколько более чувствительны по сравнению с нормальными. Молекулярная основа неизвестна
Усиление дифференцировки	1—1000	Лучше всего наблюдается в эффекторных клетках иммунной системы
Подавление дифференцировки	100—1000	Наблюдается, если для экспрессии дифференцировки необходимы индукция РНК или синтез белка
Действие на иммунную систему	10—1000	а) Подавление пролиферативных реакций типа первичного или вторичного иммунного ответа, митоген- или антиген-индуцированного blastogenesis, гиперчувствительности замедленного типа б) Усиление ответа дифференцированных клеток, например активации природных киллеров, Т-клеточной цитотоксичности, фагоцитоза и цитотоксичности макрофагов, IgE-стимулированного выброса гистамина
Усиленная экспрессия антигенов гистосовместимости (HLA-A, -B и -C) и β -микроглобулина	1—1000	Может приводить к повышенной чувствительности зараженных и опухолевых клеток к поражению эффекторными клетками, которые используют при этом антиген для распознавания. Этот эффект намного сильнее проявляется у γ -ИФН по сравнению с α -ИФН и β -ИФН

Ингибирующее действие интерферонов на размножение клеток

Ингибирующее действие интерферона на размножение клеток известно с того момента, когда Грессер и сотр. [86] обнаружили, что интерферон подавляет размножение асцитных опухолевых клеток в брюшной полости мышей, а Стюарт и сотр. [228] показали, что это свойство присуще самому интерферону, а не примесям в неочищенном препарате.

Молекулярная основа влияния интерферона на размножение клеток остается загадочной. Ниже мы вкратце обсудим основ-

ные эффекты, которые обнаружены в последние 10 лет. Хотя сделано много интересных наблюдений, ясно, что эта область находится в зачаточном состоянии. В настоящее время необходимы систематические исследования с ограниченным числом хорошо охарактеризованных клеточных линий и с использованием точно определенных концентраций индивидуальных препаратов α -ИФН, β -ИФН и γ -ИФН.

Подавление размножения клеток

Интерферон в концентрациях от 10 до 1000 ед. в 1 мл подавляет размножение самых разных клеток. И хотя такой диапазон концентраций, при которых интерферон оказывает заметное действие, частично связан с тем, что исследования были проведены в различных лабораториях, тем не менее ясно, что одни клетки более чувствительны к подавляющему действию интерферона, а другие менее. Интерфероны регулируют рост клеток многих типов, включая первичные клеточные культуры, стабильные клеточные линии, нормальные и опухолевые клетки [44, 179]. В настоящее время внимание сосредоточено на противоопухолевом действии интерферонов [83, 84], которое изучают на индуцируемых вирусом и трансплантируемых опухолях на экспериментальных животных, а также на раковых больных. В обсуждении мы рассмотрим некоторые из основных механизмов, которые лежат в основе их антипролиферативного и противоопухолевого действия.

Усиление и подавление синтеза индивидуальных белков

Обработка интерфероном приводит к индукции или подавлению синтеза многих белков. Некоторые белки индуцируются любыми интерферонами [88], другие — интерферонами лишь какого-нибудь одного класса [201]. Например, γ -ИФН индуцирует синтез нескольких белков в дополнение к тем, которые индуцируются также α -ИФН и β -ИФН [264]. Можно также легко показать, что обработка интерфероном всех трех классов запускает синтез новых уникальных видов мРНК, которые обнаруживаются в течение первых 40 мин, накапливаются в течение 2 ч и затем в течение нескольких (до 16 ч) часов остаются связанными с рибосомами [41]. При трансляции этих мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе происходит синтез нескольких новых белков. Пока идентифицированы лишь немногие из них. К наиболее хорошо изученным относятся 2,5-oligo(A)-синтетаза и протейкиназа, обсуждавшиеся выше. В нормальных тканях уровень этих ферментов варьирует, но в обоих случаях при об-

работке интерфероном он увеличивается по крайней мере в 20 раз. Предполагают, что оба фермента каким-то образом участвуют в ингибирующем действии интерферона на размножение клеток. Например, о возможном участии 2,5-oligo(A)-синтетазы в регуляции цикла клеточного размножения свидетельствует обратная зависимость между ее уровнем и долей клеток в S-фазе [44], а также способность 2,5-oligo(A)-синтетазы подавлять прохождение через S-фазу некоторых клеток, например лимфоидных [141]. К тому же известно, что кортизол индуцирует этот фермент в культивируемых фибробластах куриных эмбрионов [173], и предполагают, что снижение концентрации некоторых видов РНК (таких как мРНК проколлагена типа 1), по крайней мере частично, обусловлено активацией РНКазы L. Есть также мнение, что 2,5-oligo(A) является представителем нового класса ингибиторов метилирования мРНК (см. выше) [80]. Изучая вопрос о том, что именно активирует синтетазу в нормальных клетках, Нильсен и соавторы обнаружили следующее: гетерогенная ядерная РНК, которая, по-видимому, содержит двухцепочечные участки (шпильки), отсутствующие в мРНК, может стимулировать синтез 2,5-oligo(A); было сделано предположение, что пара 2,5-oligo(A)-синтетаза — РНКазы L работает при процессинге ядерной РНК [169].

Что касается протеинкиназы, то этот фермент легко обнаруживается не только в обработанных культивируемых клетках, но также в плазме и в органах человека и животных, синтезирующих интерферон или получивших его в результате введения [104, 132]. Она фосфорилирует белок 67K (и/или 72K), а также α -субъединицу eIF2 по остаткам серина и треонина [105, 140]. Роль протеинкиназы в подавлении размножения клеток пока не выяснена.

Еще одним ферментом, который индуцируется интерфероном, является гуанилатциклаза. Фактически увеличение ее активности — это первый выявляемый эффект интерферона, который может быть зарегистрирован в течение 30 мин [199, 246]. При концентрации интерферона в среде ~ 1 ед. на 1 мл наблюдается примерно четырехкратное увеличение активности гуанилатциклазы. Поскольку под действием интерферона концентрация циклического GMP в клетках, устойчивых к его действию не увеличивается, скорее всего гуанилатциклаза активируется благодаря взаимодействию интерферона с его поверхностным рецептором.

Интерферон индуцирует многие другие ферменты, например синтез меланина, экспрессию EBNA в клетках Дауди [247], образование 56K-белка с неизвестной функцией, мРНК для которого клонирована и частично секвенирована [38], а также запускает синтез кетостероидов в клетках надпочечников мыши [36].

Гормональная концепция действия интерферона

На сходство системы интерферона с гликопротеиновыми гормонами впервые обратил внимание Бэрон [17]. Без сомнения, у них много общих черт [25, 36, 107, 130]. Например, ясно, что антивирусная, антипролиферативная и иммуномодуляторная активности интерферона связаны с передачей сигнала от оказавшихся внутри рецепторов к соответствующим клеточным генам [222]. Помимо аналогии между рецепторами интерферона и гормонов в обоих случаях доказана активация как GMP-, так и АМР-циклазы. Имеется также сходство в том, как секретируются интерферон и гормоны [27, 51, 64], как они действуют на рост клетки и как модулируют иммунные реакции. Высказано мнение, что интерфероны принадлежат к классу «неклассических гормонов», к которому можно отнести также факторы роста, например эпидермальный фактор роста (ЭФР); фактор роста тромбоцитов (ФРТ); белки, родственные инсулину, например соматомедин и инсулиноподобные факторы роста (ИПФР); факторы роста нейронов; трансформирующие факторы роста (ТФР); и активность, стимулирующую размножение клеток (АСР). Не будет неожиданностью, если окажется, что интерферон и эти гормоноподобные факторы произошли от общего предшественника.

Влияние интерферона на структурные компоненты клетки

Влияние интерферонов на структурные компоненты клетки двояко. Во-первых, они способствуют лучшей организации микрофиламентов, промежуточных филаментов и фибронектина [181], увеличивают количество подмембранных микрофиламентов в таких клетках, как HeLa, растущих в суспензионной культуре [259], и увеличивают число контактов промежуточного типа. Сходным образом действует бутират, который при введении совместно с интерфероном дает аддитивный эффект. В линии клеток, трансформированной вирусом и культивируемой на протяжении многих пассажей в присутствии β -ИФН, хорошо развитые цитоскелетная сеть и внеклеточный матрикс напоминают аналогичные структуры у нормальных нетрансформированных клеток [29].

Во-вторых, интерфероны сильно влияют на плазматические мембраны клетки. В частности, они увеличивают ригидность липидного бислоя (что может быть выявлено по использованию спиновых меток) [178] и подавляют перераспределение поверхностных компонентов, называемое «кэпированием» [180]. Повидимому, как в нормальной, так и в опухолевой клетках интерфероны индуцируют координированный ответ плазматических мембран и выстилающих их микрофиламентов.

Влияние интерферона на дифференцировку

Некоторые функции дифференцированных клеток интерфероны подавляют, другие усиливают. Например, интерфероны подавляют секрецию активатора плазминогена; меланогенез, стимулируемый гормоном меланоцитов [68]; превращение мышечных фибробластов в адипоциты [123]. Но вместе с тем они стимулируют индукцию дифференцировки клеток миелоидного лейкоза мышей [243], индуцируют дифференцировку лейкозных клеток в макрофаги и гранулоциты и стимулируют миогенез в культуре миобластов человека. Они также способствуют восстановлению контактного торможения и усиливают отбор ревертантов из клеток, трансформированных вирусом. Не исключено, что противоопухолевое действие интерферона связано с его способностью модулировать клеточную дифференцировку [69].

Влияние интерферона на иммунную систему

Влияние интерферона на иммунную систему становится предметом все более детальных и интенсивных исследований [52]. Интерфероны подавляют появление аллоспецифических супрессорных Т-лимфоцитов [71], увеличивают активность естественных киллеров человека (особенно β -ИФН), подавляют пролиферацию макрофагов из костного мозга [48], уменьшают индуцированное антигенами или митогенами подавление миграции лейкоцитов [232]. α -ИФН и β -ИФН усиливают также синтез и экспрессию HLA-A, HLA-B, HLA-C и β -микροглобулина в различных клетках человека [19, 66, 258]. Наблюдаемый эффект столь же велик, как и в случае 2,5-oligo(A)-синтетазы, но необходимые для его проявления концентрации интерферона более чем в 1000 раз ниже тех, которые требуются для индукции синтетазы и возникновения антивирусного состояния [258].

Исследование клеточных линий, устойчивых к интерферону

Описан ряд линий клеток человека и мыши, обладающий устойчивым к интерферону фенотипом. Некоторые из них спонтанно устойчивы [39], тогда как другие приобрели устойчивость после многократного пассирования в присутствии интерферона [8, 85, 136]. Существуют клеточные линии, обладающие устойчивостью по отношению ко всем воздействиям интерферона; другие устойчивы только к некоторым из них. Изучение таких клеточных линий может пролить свет на механизмы действия интерферона. Например, в устойчивых к интерферону вариантах клеток эритролейкоза Френд, выделенных при непрерывном

росте в среде, содержащей интерферон, антивирусное действие интерферона по отношению к литическим вирусам и ретровирусам не проявляется, но ДМСО-стимулированная эритроидная дифференцировка подавляется [18]. В другой работе исследовали уровень и индуцибельность 2,5-oligo(A)-синтетазы и протеинкиназы в клетках НЕС-1, которые совершенно нечувствительны к антивирусной активности α -ИФН, β -ИФН и γ -ИФН и антипролиферативной активности α -ИФН и β -ИФН, но чувствительны к антипролиферативной активности γ -ИФН; активность обоих ферментов высока в необработанных клетках НЕС-1 и лишь немного усиливается после обработки интерферонами [253, 254]. Аналогично этому в линиях клеток хориокарциномы человека подавление роста клеток и антивирусное состояние по отношению к VSV не развиваются под действием интерферона, тогда как и синтетаза, и протеинкиназа индуцируются, и интерферон подавляет размножение вируса ЕМС [250]. Таким образом, либо обе активности недостаточны для установления антивирусного состояния, либо для его проявления необходим утраченный в этих клетках общий для этих двух ферментов регуляторный механизм. Это может объяснить как конститутивность обоих ферментов, так и устойчивость к интерферону. Остается, правда, еще одна возможность, состоящая в том, что оба фермента не имеют отношения к установлению антивирусного состояния.

Перспективы клинического использования

В клинических условиях были проведены многочисленные работы с интерферонами [24, 151, 239]. Сначала их проводили с целью использования антивирусной активности интерферонов. В настоящее время представляется маловероятным, что интерфероны найдут широкое применение в качестве противовирусных агентов при таких заболеваниях, как грипп или герпесные инфекции, однако их, по-видимому, удастся использовать для лечения заболеваний, опасных для жизни, таких как бешенство, геморрагические лихорадки, герпетические энцефалиты, а также для лечения персистентных инфекций, вызываемых вирусом гепатита В, VZV, вирусом папилломы (бородавок) и цитомегаловирусом.

В последнее время выраженные и разнообразные действия интерферонов на иммунорегуляторные механизмы привлекли внимание к интерферонам как к лимфокинам, т. е. растворимым эффекторам иммунных реакций. Не исключено, что γ -ИФН и фактор активации макрофагов (ФАМ) идентичны [197]. Если учесть также то, что интерфероны обладают антипролиферативной активностью, то можно понять надежды, которые возлага-

ются на них как на противораковых агентов. В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания с целью изучения возможности лечения интерфероном таких неоплазий, как рак легкого, рак груди, рак мозга, остеогенная саркома, миелома, лимфома, гепатома и др. Исследования проводят с интерферонами всех классов, однако основные надежды возлагают на γ -ИФН, для которого соотношение антипролиферативной и антивирусной активности намного выше, чем для α -ИФН и β -ИФН.

Клинические испытания требуют очень больших количеств интерферона; обычно для получения клинического эффекта необходимы ежедневные инъекции от 1 до 5 млн. ед. Такие большие количества интерферона нельзя получить из лейкоцитов или культивируемых фибробластов. Однако теперь ситуация меняется, поскольку становятся доступными большие количества клонированного интерферона. Это будет способствовать наступлению новой эры в использовании интерферонов в качестве противовирусного и противоракового препарата. Клонированные интерфероны позволяют не только проводить длительные крупномасштабные клинические испытания; по мере того как будет проведена функциональная характеристика отдельных доменов интерферонов, технология рекомбинантных ДНК позволит также создать молекулы интерферона, специально предназначенные для лечения определенных инфекций и опухолей.

К сожалению, интерфероны могут вызывать некоторые побочные нежелательные эффекты, такие как лихорадка, гипотония, миалгия, тахикардия и нарушения функции печени. Однако побочные эффекты допустимы в случае лечения заболеваний, угрожающих жизни. α -ИФН, но не интерфероны других классов связываются с опиатными рецепторами *in vitro* и при интрацеребральном введении вызывают у мышей эндорфиноподобное опиоидное действие, а именно аналгезию, отсутствие спонтанной локомоции и каталепсию [26]. Все эти эффекты можно предотвратить и обратить опиатным антагонистом налоксоном. Таким образом, некоторые побочные эффекты α -интерферона могут осуществляться в результате связывания с опиатными рецепторами. Другая проблема состоит в том, что все интерфероны сильно увеличивают инвазивность клеток саркомы [220]. Остается надеяться, что технология рекомбинантных ДНК позволит сконструировать молекулы интерферона, которым не будут свойственны подобные побочные эффекты.

Дополнение, внесенное в гранки. Недавно вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* использовали в качестве вектора для гена интерферона человека. Получены очень большие выходы интерферона из клеток насекомых, зараженных этим вирусом со встроенным геном β -ИФН человека [224a].

Литература

1. Abb J., Abb H., Deinhardt F. (1982). Retinoic acid suppression of human leukocyte interferon production, *Immunopharmacology*, **4**, 303—310.
2. Aboud M., Hassan Y. (1983). Accumulation and breakdown of RNA-deficient intracellular virus particles in interferon-treated NIH 3T3 cells chronically producing Moloney murine leukemia virus, *J. Virol.*, **45**, 489—495.
3. Aboud M., Huleihel M. (1981). Rapid syncytium formation induced by Moloney murine sarcoma virus in 3T3/NIH cells and its delay by mouse interferon, *Arch. Virol.*, **70**, 103—114.
4. Abreu S. L., Bancroft F. C., Stewart W. E., II (1979). Interferon priming: Effects on interferon messenger RNA, *J. Biol. Chem.*, **254**, 4114—4118.
5. Adolf G. R., Swetly P. (1980). Tumor-promoting phorbol esters inhibit DNA synthesis and enhance virus-induced interferon production in a human lymphoma cell line, *J. Gen. Virol.*, **51**, 61—67.
6. Adolf G. R., Swetly P. (1982). Interferon production in human hematopoietic cell line: Response to chemicals and characterization of interferons, *J. Int. Res.*, **2**, 261—270.
7. Adolf G. R., Haas O. A., Fischer P., Swetly P. (1982). Spontaneous production of alpha- and beta-interferon in human lymphoblastoid and lymphoma cell lines, *Arch. Virol.*, **72**, 169—178.
8. Affabris E., Jemma C., Rossi G. B. (1982). Isolation of interferon-resistant variants of Friend erythroleukemia cells: Effects of interferon and ouabain, *Virology*, **120**, 441—452.
9. Aguet M., Blanchard B. (1981). High-affinity binding of ^{125}I -labeled mouse interferon to a specific cell surface receptor: II. Analysis of binding properties, *Virology*, **115**, 249—261.
10. Aguet M., Belardelli F., Blanchard B., Marcucci F., Gresser I. (1982). High-affinity binding of ^{125}I -labeled mouse interferon to a specific cell surface receptor: IV. Mouse interferon and cholera toxin do not compete for the common receptor site of α/β interferon, *Virology*, **117**, 541—544.
11. Allen P. T., Schellekens H., Van Griensven L. J. L. D., Billiau A. (1976). Differential sensitivity of Rauscher murine leukemia virus (MuLV) to interferons in two interferon-responsive cell lines, *J. Gen. Virol.*, **31**, 429—435.
12. Anderson P., Yip Y. K., Vilcek J. (1983). Human interferon- γ is internalized and degraded by cultured fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **258**, 6497—6502.
13. Avery R. J., Norton J. D., Jones J. S., Burke D. C., Morris A. G. (1980). Interferon inhibits transformation by murine sarcoma viruses before integration of provirus, *Nature*, **288**, 93—95.
14. Baglioni C., Maroney P. A. (1980). Mechanism of action of human interferons: induction of 2', 5'-oligo (A) polymerase, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8390—8393.
15. Baglioni C., Minks M. A., De Clercq E. (1981). Structural requirements of polynucleotides for the activation of (2'—5') A_n polymerase and protein kinase, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4939—4950.
16. Balkwill F. R., Griffin D. B., Band H. A., Beverley P. C. L. (1983). Immune human lymphocytes produce an acid-labile α -interferon, *J. Exp. Med.*, **157**, 1059—1063.
17. Baron S. (1966). The biological significance of the interferon system. In: *Interferons*, ed. by N. B. Finter, pp. 268—293, North-Holland, Amsterdam.
18. Baron S., Dianzani F., Stanton G. J. (eds.) (1982). *The Interferon System: A Review to 1982*, Vol. 41, Tex. Rep. Biol. Med.
19. Basham T. Y., Bourgeade M. F., Creasey A. A., Merigan T. C. (1982). Interferon increases HLA synthesis in melanoma cells: Interferon-resistant and -sensitive cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3265—3269.
20. Belardelli F., Aliberti A., Santurbano B., Antonelli G., d'Agnoles G., Ros-

- si G. B.* (1982). Interferon-induced antiviral actions in Friend leukemia cells: Role of membrane gangliosides, *Virology*, **117**, 391—400.
21. *Berg K., Heron I.* (1980). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified human leukocyte interferon and the antiviral and anticellular activities of the different interferon species, *J. Gen. Virol.*, **50**, 441—446.
22. *Besançon F., Ankel H.* (1974). Binding of interferon to gangliosides, *Nature*, **252**, 478—480.
23. *Billello J., Wivel N. A., Pitha P. M.* (1982). Effect of interferon on the replication of Mink cell focus-inducing virus in murine cells: Synthesis, processing, assembly, and release of viral proteins, *J. Virol.*, **43**, 213—222.
24. *Billiau A.* (1981). Interferon therapy: Pharmacokinetic and pharmacological aspects, *Arch. Virol.*, **67**, 121—133.
25. *Blalock J. E., Harp C.* (1981). Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity, *Arch. Virol.*, **67**, 45—49.
26. *Blalock J. E., Smith E. M.* (1981). Human leukocyte interferon (HuIFN- α): Potent endorphin-like opioid activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 472—478.
27. *Bocci G.* (1981). Production and the role of interferon in physiological conditions, *Biol. Rev.*, **56**, 49—85.
28. *Bourgeade M. F., Chany C., Merigan T. C.* (1980). Type I and type II interferons: Differential antiviral actions in transformed cells, *J. Gen. Virol.*, **46**, 449—454.
29. *Bourgeade M. F., Rousset S., Paulin D., Chany C.* (1981). Reorganization of the cytoskeleton by interferon in MSV transformed cells, *J. Int. Res.*, **1**, 323—332.
30. *Bosveld I. J., Bonk W. P., Hekman R. A. C. P., van Vliet P. W., de Jonge P., van Ewijk W., Trapman J.* (1982). Preparation and properties of monoclonal antibodies against murine interferon- β , *Virology*, **120**, 235—239.
31. *Branca A. A., Baglioni C.* (1981). Evidence that type I and II interferons have different receptors, *Nature*, **294**, 768—770.
32. *Branca A. A., D'Alessandro S. B., Baglioni C.* (1982). Direct evidence that the gene product of the human chromosome 21 locus, IFRC, is the interferon- α receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1060—1066.
33. *Broeze R. J., Daugherty J. P., Pichon J., Jayaram B. M., Lengyel P.* (1981). Studies with pure mouse Ehrlich ascites tumor interferons α and β : Patterns of induction of 2—5A synthetase and a double-stranded RNA-dependent protein kinase in mouse cells and human cells, *J. Int. Res.*, **1**, 191—202.
34. *Canaani D., Berg P.* (1982). Regulated expression of human interferon β 1 gene after transduction into cultured mouse and rabbit cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5166—5170.
35. *Chaloulos D., Crepin M., Lebleu D.* (1982). Effects of interferon on the expression of mouse mammary tumor virus in GR cells, *J. Gen. Virol.*, **62**, 65—80.
36. *Chany C., Mathieu D., Gregoire A.* (1980). Induction of Δ_3^4 ketosteroid synthesis by interferon in mouse adrenal tumor cell cultures, *J. Gen. Virol.*, **50**, 447—450.
37. *Chatterjee S., Cheung H. C., Hunter E.* (1982). Interferon inhibits Sendai virus-induced cell fusion: An effect on cell membrane fluidity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 835—839.
38. *Chebath J., Merlin G., Metz K., Benech P., Revel M.* (1983). Interferon-induced 56 000 M_r protein and its mRNA in human cells: molecular cloning and partial sequence of the cDNA, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1223—1226.
39. *Chen H. Y., Sato T., Fuse A., Kuwata T., Content J.* (1981). Resistance to interferon of a human adenocarcinoma cell line, HEC-1, and its sensitivity to natural killer cell action, *J. Gen. Virol.*, **52**, 177—181.

40. Christofinis G. J., Steel C. M., Finter N. B. (1981). Interferon production by human lymphoblastoid cell lines of different origins, *J. Gen. Virol.*, **52**, 169—171.
41. Colonna R. J., Pang R. H. L. (1982). Induction of unique mRNAs by human interferons, *J. Biol. Chem.*, **257**, 9234—9237.
42. Content J., De Wit L., Derynck R., De Clercq E., Fiers W. (1982). In vitro cotranslational processing of human pre-interferon β 1 enhances its biological activity, *Virology*, **122**, 466—471.
43. Content J., Johnston M. I., De Wit L., De Maeyer-Guignard J., De Clercq E. (1980). Kinetics and distribution of interferon mRNA in interferon-primed and unprimed mouse L-929 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 415—424.
44. Creasey A. A., Eppstein D. A., Marsch Y. V., Kahn Z., Merigan T. C. (1983). Growth regulation of melanoma cells by interferon and (2'—5') oligoadenylate synthetase, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 780—786.
45. Czarniecki C. W., Sreevalsan T., Friedman R. M., Panet A. (1981). Dissociation of interferon effects on murine leukemia virus and encephalomyocarditis virus replication in mouse cells, *J. Virol.*, **37**, 827—831.
46. Daher K. A., Samuel C. E. (1981). Mechanism of interferon action: Stability and translation of simian virus-40 early mRNA coding for T-antigen is comparable in untreated and interferon-treated monkey cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 697—703.
47. Daher K. A., Samuel C. E. (1982). Mechanism of interferon action. Differential effect of interferon on the synthesis of simian virus 40 and reovirus polypeptides in monkey kidney cells, *Virology*, **117**, 379—390.
48. Dandoy F., DeMaeyer E., DeMaeyer-Guignard J. (1981). Antiproliferative action of interferon on murine bone marrow derived macrophages in influenced by the genotype of the marrow donor, *J. Int. Res.*, **1**, 263—270.
49. de Ferra F., Baglioni C. (1983). Increase in S-adenosylhomocysteine concentration in interferon-treated HeLa cells and inhibition of methylation of vesicular stomatitis virus mRNA, *J. Biol. Chem.*, **258**, 2118—2121.
50. DeGrado W. F., Wasserman Z. R., Chowdhry V. (1982). Sequence and structural homologies among type I and type II interferons, *Nature*, **300**, 379—381.
51. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J. (1979). Interferons. In: Comprehensive Virology, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 205—284, Plenum Press, New York.
52. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J. (1981). Interferons as regulatory agents of the immune system, *CRC Crit. Rev. Immunol.*, **2**, 167—188.
53. Derynck R., Singh A., Goeddel D. V. (1983). Expression of the human interferon-gamma cDNA in yeast, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1819—1837.
54. Derynck R., Leung D. W., Gray P. W., Goeddel D. V. (1982). Human interferon- γ is encoded by a single class of mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3605—3615.
55. Derynck R., Remaut E., Saman E., Stanssens P., De Clercq E., Content J., Fiers W. (1980). Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*, *Nature*, **287**, 193—197.
56. Devos R., Cheroutre H., Taya Y., Degrave W., Van Heuverswyn H., Fiers W. (1982). Molecular cloning of human immune interferon cDNA and its expression in eukaryotic cells, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2487—2501.
57. Dianzani F., Gagnoni S., Buckler C. E., Baron S. (1970). Studies of the induction of interferon system by nonreplicating Newcastle disease virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**, 324—328.
58. Dorner F., Scriba M., Weil R. (1973). Interferon: Evidence for its glycoprotein nature, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1981—1985.
59. Drocourt J.-L., Dieffenbach C. W., Ts'o P. O. P. (1982). Structural requirements of (2'—5') oligoadenylate for protein synthesis inhibition in human fibroblasts, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2163—2174.

60. Dubois M.-F., Vignal M., Le Cunff M., Chany C. (1983). Interferon inhibits transformation of mouse cells by exogenous cellular or viral genes, *Nature*, **303**, 433—435.
61. Dubovi E. J., Akers T. G. (1972). Interferon induction by Colorado tick fever virus: A double-stranded RNA virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 123—127.
62. Duc-Goiran P., Robert-Galliot B., Chudzio T., Chany C. (1983). Unusual human interferons produced by virus-infected amniotic membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2628—2631.
63. Efrat S., Pilo S., Kaempfer R. (1982). Kinetics of induction and molecular size of mRNAs encoding human interleukin-2 and γ -interferon, *Nature*, **297**, 236—239.
64. Epstein L. P. (1981). Interferon as a model lymphokine, *Fed. Proc.*, **40**, 56—61.
65. Faltinek C. R., Branca A. A., McCandless S., Baglioni C. (1983). Characterization of an interferon receptor on human lymphoblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3269—3273.
66. Fellous M., Nir U., Wallach D., Merlin G., Rubinstein M., Revel M. (1982). Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3082—3086.
67. Field A. K., Tytell A. A., Lampson G. T., Nemes M. M., Hilleman M. R. (1970). Double-stranded polynucleotides as interferon inducers, *J. Gen. Physiol.*, **57**, 90S.
68. Fisher P. B., Mufson R. A., Weinstein I. B. (1981). Interferon inhibits melanogenesis in B-16 mouse melanoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 823—830.
69. Fisher P. B., Miranda A. F., Babiss L. E., Pestka S., Weinstein B. (1983). Opposing effects of interferon produced in bacteria and of tumor promoters on myogenesis in human myoblast cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2961—2965.
70. Floyd-Smith G., Slattery E., Lengyel P. (1981). Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'—5') oligoadenylate-dependent endonuclease, *Science*, **212**, 1030—1032.
71. Fradelizi D., Gresser I. (1982) Interferon inhibits the generation of allospecific suppressor T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **155**, 1610—1622.
72. Frey T. K., Jones E. V., Cardamone J. J., Jr., Youngner J. S. (1979). Induction of interferon in L cells by defective-interferon (DI) particles of vesicular stomatitis virus: Lack of correlation with content of $[\pm]$ snapback RNA, *Virology*, **99**, 95—102.
73. Friedman R. M. (1979). Interferons: Interactions with cell surfaces. In: *Interferon*, 1979, Vol. 1, ed. by I. Gresser, pp. 53—74, Academic Press, New York.
74. Friedman R. M., Sonnabend J. A. (1964). Inhibition of interferon action by *p*-fluorophenylalanine, *Nature*, **203**, 366—368.
75. Fujisawa I.-I., Kawade Y. (1981). Properties of nonglycosylated and glycosidase-treated mouse L cell interferon species, *Virology*, **112**, 480—487.
76. Fujita T., Kohno S. (1981). Studies on interferon priming: Cellular response to viral and nonviral inducers and requirements of protein synthesis, *Virology*, **112**, 62—69.
77. Fuller F. J., Marcus P. I. (1980). Interferon induction by viruses: IV. Sindbis virus: Early passage defective-interfering particles induce interferon, *J. Gen. Virol.*, **48**, 63—73.
78. Goeddel D. V., Yelverton E., Ullrich A., Heyneker H. L., Miozzari G., Holmes W., Seeburg P. H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandless R., Sloma A., Tabor J. M., Gross M., Familletti P. C., Pestka S.

- (1980). Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active, *Nature*, **287**, 411—416.
79. Gomatos P. J. (1967). RNA synthesis in reovirus-infected L929 mouse fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1798—1805.
 80. Goswami B. B., Crea R., Van Boom J. H., Sharma O. K. (1982). 2'—5' linked oligo(adenilic acid) and its analogs: A new class of inhibitors of mRNA methylation, *J. Biol. Chem.*, **257**, 6867—6870.
 81. Gray P. W., Goeddel D. V. (1982). Structure of the human immune interferon gene, *Nature*, **298**, 859—863.
 82. Gray P. W., Leung D. W., Pennica D., Yelverton E., Najarian R., Simonson C. C., Derynck R., Sherwood P. J., Wallace D. M., Berger S. L., Levinson A. D., Goeddel D. V. (1982). Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells, *Nature*, **295**, 503—508.
 83. Gresser I. (1977). Antitumor effects of interferon. In: *Cancer: A Comprehensive Treatise*, Vol. 5, ed. by F. F. Becker, pp. 521—571, Plenum Press, New York.
 84. Gresser I., Tovey M. G. (1978). Antitumor effects of interferon, *Biochim. Biophys. Acta*, **516**, 231—247.
 85. Gresser I., Bandu M. T., Brouty-Boye D. (1974). Interferon and cell division: IX. Interferon-resistant L1210 cells: Characteristics and origin, *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 553—559.
 86. Gresser I., Bourali C., Levy J. P., Fontaine-Brouty-Boyé D., Thomas M. T. (1969). Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 51—55.
 87. Gupta S., Holmes S. L., Mehra L. L. (1982). Interferon action against reovirus: Activation of interferon-induced protein kinase in mouse L929 cells upon reovirus infection, *Virology*, **120**, 495—499.
 88. Gupta S. L., Rubin B. Y., Holmes S. L. (1979). Interferon action: Induction of specific proteins in mouse and human cells by homologous interferons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4817—4821.
 89. Hauser H., Gross G., Bruns W., Hochkeppel H.-K., Mayr U., Collins J. (1982). Inducibility of human β -interferon gene in mouse L-cell clones, *Nature*, **297**, 650—654.
 90. Havell E. A., Carter W. A. (1981). Effects of tunicamycin on the physical properties and antiviral activities of murine L cell interferon, *Virology*, **108**, 80—86.
 91. Havell E. A., Vilcek J. (1972). Production of hightitered interferon in cultures of human diploid cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 476—484.
 92. Havell E. A., Hayes T. G., Vilcek J. (1978). Synthesis of two distinct interferons by human fibroblasts, *Virology*, **89**, 330—334.
 93. Hayes T. G. (1981). Differences between human α (leukocyte) and β (fibroblasts) interferons, *Arch. Virol.*, **67**, 267—281.
 94. Haynes J., Weissmann C. (1983). Constitutive, longterm production of human interferons by hamster cells containing multiple copies of a cloned interferon gene, *Nucleic Acids. Res.*, **11**, 687—706.
 95. Heller E. (1963). Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D, *Virology*, **21**, 652—656.
 96. Henderson D. R., Joklik W. K. (1978). The mechanism of interferon induction by UV-irradiated reovirus, *Virology*, **91**, 389—406.
 97. Herz R. E., Rubin B. Y., Sen G. C. (1983). Human interferon- α and γ -mediated inhibition of retrovirus production in the absence of any inhibitory effect on vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus replication in RD-114 cells, *Virology*, **125**, 246—250.
 98. Hitzeman R. A., Hagie F. E., Levine H. L., Goeddel D. V., Ammerer G., Hall B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast, *Nature*, **293**, 717—722.
 99. Hobbs D. S., Pestka S. (1982). Purification and characterization of interfe-

- rons from a continuous myeloblastic cell line, *J. Biol. Chem.*, **257**, 4071—4076.
100. *Hochkeppel H. K., de Ley M.* (1982). Monoclonal antibody against human IFN- γ , *Nature*, **296**, 258—259.
 101. *Holmes S. L., Gupta S. L.* (1982). Interferon action in human fibroblasts: Induction of 2', 5'-oligoadenylate synthetase in the absence of detectable protein kinase activity, *Arch. Virol.*, **72**, 137—142.
 102. *Hovanessian A. G., Kerr I. M.* (1979). The (2'—5') oligoadenylate (pppA2'—5'A2'—5'A) synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells, *Eur. J. Biochem.*, **93**, 515—526.
 103. *Hovanessian A. G., Meurs E., Montagnier L.* (1981). Lack of systematic correlation between the interferon-mediated antiviral state and the levels of 2—5A synthetase and protein kinase in three different types of murine cells, *J. Int. Res.*, **1**, 179—190.
 104. *Hovanessian A. G., Rivière Y., Montagnier L., Michelson M., Lacour J., Lacour F.* (1982). Enhancement of interferon-mediated protein kinase in mouse and human plasma in response to treatment with polyadenylic-polyuridylic acid (poly A:poly U), *J. Int. Res.*, **2**, 209—215.
 105. *Hovanessian A. G., Rollin P., Rivière Y., Pouillart P., Sureau D., Montagnier L.* (1981). Protein kinase in human plasma analogous to that present in control and interferon-treated HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1371—1377.
 106. *Huez G., Silhol M., Lebleu B.* (1983). Microinjected interferon does not promote an antiviral response in HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 155—160.
 107. *Inglot A. D.* (1983). The hormonal concept of interferon, *Arch. Virol.*, **76**, 1—13.
 108. *Imai M., Sano T., Yanase Y., Miyamoto K., Yonehara S., Mori H., Honda T., Fukuda S., Nakamura T., Miyakawa Y., Mayumi M.* (1982). Demonstration of two subtypes of human leukocyte interferon (IFN- α) by monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, **128**, 2824—2825.
 109. *Isaacs A., Burke D. C.* (1958). Mode of action of interferon, *Nature*, **182**, 1073—1076.
 110. *Isaacs A., Lindenmann J.* (1957). Virus interference: I. The interferon, *Proc. R. Soc. Lond. [B]*, **147**, 258—263.
 111. *Ito Y., Hosaka Y.* (1983). Component(s) of Sendai virus that can induce interferon in mouse spleen cells, *Infect. Immun.*, **39**, 1019—1023.
 112. *Jacobsen S., Friedman R. M., Pfau C. J.* (1981). Interferon induction by lymphocytic choriomeningitis viruses correlates with maximum virulence, *J. Gen. Virol.*, **57**, 275—283.
 113. *Jacobsen H., Czarniecki C. W., Krause D., Friedman R. M., Silverman R. H.* (1983). Interferon-induced synthesis of 2—5 A-dependent RNase in mouse JLS—V9R cells, *Virology*, **125**, 496—501.
 114. *Jameson P., Schoenherr C. K., Grossberg S.* (1978). Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice, *Infect. Immun.*, **20**, 321—323.
 115. *Jay F. T., Dawood M. R., Friedman R. M.* (1983). Interferon induces the production of membrane protein-deficient and infectivity-defective vesicular stomatitis virions through interference in the virion assembly process, *J. Gen. Virol.*, **64**, 707—712.
 116. *Jayram B. M., Schmidt H., Yoshie O., Lengyel P.* (1983). Simple procedure for the isolation of mouse interferon- β , *J. Int. Res.*, **3**, 177—180.
 117. *Johnston M. D.* (1980). Enhanced production of interferon from human lymphoblastoid (Namalwa) cells pretreated with sodium butyrate, *J. Gen. Virol.*, **50**, 191—194.
 118. *Joklik W. K.* (1965). The molecular basis of the viral eclipse phase, *Prog. Med. Virol.*, **7**, 44—96.

119. *Joklik W. K., Merigan T. C.* (1966). Concerning the mechanism of action of interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 558—565.
120. *Joshi A. R., Sarkar F. H., Gupta S. L.* (1982). Interferon receptors: Cross-linking of human leukocyte interferon $\alpha 2$ to its receptor on human cells, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13884—13887.
121. *Kaempfer R., Israeli R., Rosen H., Knoller S., Zilberstein A., Schmidt A., Revel M.* (1979). Reversal of the interferon-induced block of protein synthesis by purified preparations of eucaryotic initiation factor 2, *Virology*, **99**, 170—173.
122. *Kaufman H. E., Centifanto Y. M., Ellison E. D., Brown D. C.* (1971). Tilorone hydrochloride: Human toxicity and interferon stimulation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 357—362.
123. *Keay S., Grossberg S. E.* (1980). Interferon inhibits the conversion of 313—L1 mouse fibroblasts into adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4099—5103.
124. *Kerr I. M., Brown R. E.* (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 256—260.
125. *Kerr I. M., Brown R. E., Ball L. A.* (1974). Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment, *Nature*, **250**, 57—59.
126. *Knight E., Jr.* (1976). Interferon: Purification and initial characterization from human diploid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 520—523.
127. *Knight E., Jr., Fahey D.* (1981). Human fibroblast interferon: An improved purification, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3609—3611.
128. *Knight E., Jr., Fahey D.* (1982). Human interferon- β : Effects of deglycosylation, *J. Int. Res.*, **2**, 421—429.
129. *Kohase M., Kohno S.* (1983). Temperature-sensitive mutants of Newcastle disease virus affecting interferon induction, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1469—1474.
130. *Kohn L. D.* (1978). Relationship in the structure and function of receptors for glycoprotein hormones, bacterial toxins and interferon. In: *Receptor and Recognition*, ed. by P. Cuatrecasas and M. S. Greaves, series A5, pp. 135—212, Chapman and Hall, London.
131. *Kohn L. D., Friedman R. M., Holmes J. M., Lee G.* (1976). Use of thyrotropin and cholera toxin to probe the mechanism by which interferon initiates its antiviral activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3695—3699.
132. *Krishnan I., Baglioni C.* (1981). Regulation of 2', 5'-oligo(A) polymerase activity in quiescent human fibroblasts treated with interferon, *Virology*, **111**, 666—670.
133. *Krust B., Rivière Y., Hovanessian A. G.* (1982). p67 K kinase in different tissues and plasma of control and interferon-treated mice, *Virology*, **120**, 240—246.
134. *Kushnaryov V. M., MacDonald H. S., Sedmak J. J., Grossberg S. E.* (1983). Ultrastructural distribution of interferon receptor sites on mouse L fibroblasts growing in suspension: Ganglioside blockage of ligand binding, *Infect. Immun.*, **40**, 320—329.
135. *Kushnaryov V. M., Sedmak J. J., Bendler J. W., III, Grossberg S. E.* (1982). Ultrastructural localization of interferon receptors on the surfaces of cultured cells and erythrocytes, *Infect. Immun.*, **36**, 811—821.
136. *Kuwata T., Fuse A., Morinaga N.* (1976). Effect of interferon upon cell and virus growth in transformed human cell lines, *J. Gen. Virol.*, **33**, 7—15.
137. *Lai M.-H. T., Joklik W. K.* (1973). The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles, *Virology*, **51**, 191—204.
138. *Lampson G. P., Field A. K., Tytell A. A., Hilleman M. R.* (1981). Poly I:C/poly-L-lysine: Potent inducer of interferons in primates, *J. Int. Res.*, **1**, 539—549.

139. Lampson G. P., Tytell A. A., Field A. K., Nemes M. M., Hilleman M. R. (1967). Inducers of interferon and host resistance: I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosus*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 782—786.
140. Lasky S. R., Jacobs B. L., Samuel C. E. (1982). Mechanism of interferon action: Characterization of sites of phosphorylation in the interferon-induced phosphoprotein P1 from mouse fibroblasts: Evidence for two forms of P1, J. Biol. Chem., **257**, 11087—11093.
141. Leanderson T., Norfelth R., Lundgren E. (1982). Antiproliferative effect of (2'—5') oligoadenylate distinct from that of interferon in lymphoid cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., **107**, 511—517.
142. Lebleu B., Sen G. C., Shaila S., Cabrer D., Lengyel P. (1976). Interferon, double-stranded RNA, and protein phosphorylation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3107—3111.
143. Lengyel P. (1982). Biochemistry of interferons and their actions, Ann. Rev. Biochem., **51**, 251—282.
144. Levin D. H., Ranu R. S., Ernst V., London I. M. (1976). Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: Phosphorylation of methionyl-tRNA_i binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from heme-deficient lysates, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3112—3116.
145. Lewis J. A., Mengheri E. E., Esteban M. (1983). Induction of an antiviral response by interferon requires thymidine kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 26—30.
146. Lockart R. Z., Jr., Bayliff M. L., Toy S. T., Yin F. H. (1968). Viral events necessary for the induction of interferon in chick embryo cells, J. Virol., **2**, 962—965.
147. Lomniczi B., Burke D. C. (1970). Interferon production by temperature-sensitive mutants of Semliki Forest virus, J. Gen. Virol., **8**, 55—68.
148. Marcus P. I., Sekellick M. J. (1977). Defective interfering particles with covalently linked (\pm) RNA can induce interferon, Nature, **266**, 815—819.
149. Marcus P. I., Sekellick M. J. (1980). Interferon induction by viruses: III. Vesicular stomatitis virus: Interferon-inducing particle activity requires partial transcription of gene N, J. Gen. Virol., **47**, 89—96.
150. Merigan T. C. (1973). Non-viral substances which induce interferons. In: Interferons and Interferon Inducers, ed. by N. B. Finter, pp. 45—71, Americal Elsevier Publishing Co., New York.
151. Merigan T. C., Rand K. H., Pollard R., Abdallah P. S., Jordan G. W., Fried R. P. (1978). Human leukocyte interferon for the treatment of herpes zoster in patients with cancer, N. Engl. J. Med., **298**, 981—987.
152. Meurs E., Hovanessian A. G., Montagnier L. (1981). Interferon mediated antiviral state in human cells in the absence of detectable levels of 2—5A synthetase and protein kinase, J. Int. Res., **1**, 219—232.
153. Miller D. L., Kung H.-F., Pestka S. (1982). Crystallization of recombinant human leukocyte interferon A, Science, **215**, 689—690.
154. Minks M. A., West D. K., Benven S., Green J. J., Ts'o P. O. P., Baglioni C. (1980). Activation of 2', 5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells by 2'-O-methylated poly(inosinic acid)·Poly(cytidylic acid): Correlations with interferon-inducing activity, J. Biol. Chem., **255**, 6403—6407.
155. Miyamoto N. G., Samuel C. E. (1980). Mechanism of interferon action: Interferon-mediated inhibition of reovirus mRNA translation in the absence of detectable mRNA degradation but in the presence of protein phosphorylation, Virology, **107**, 461—475.
156. Miyata T., Hayashida H. (1982). Recent divergence from a common ancestor of human IFN- α genes, Nature, **295**, 165—168.
157. Morris A. G., Morser J., Meager A. (1982). Spontaneous production of gam-

- ma interferon and induced production of beta interferon by human T-lymphoblastoid cell lines, *Infect. Immun.*, **35**, 533—536.
158. *Morser J., Meager A., Burke D. C., Secher D. S.* (1981). Production and screening of cell hybrids producing a monoclonal antibody to human interferon- α . *J. Gen. Virol.*, **53**, 257—265.
 159. *Mozes L. W., Defendi V.* (1979). The differential effect of interferon on T-antigen production in Simian virus 40-infected or transformed cells, *Virology*, **93**, 558—568.
 160. *Munoz A., Carrasco L.* (1981). Protein synthesis and membrane integrity in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus, *J. Gen. Virol.*, **56**, 153—162.
 161. *Nagata S., Taira T. H., Hall A., Johnstrud L., Streuli M., Ecsodi J., Ball W., Cantell K., Weissman C.* (1980). Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity, *Nature*, **284**, 316—320.
 162. *Naso R. B., Wu Y. C., Edbauer C. A.* (1982). Antiretroviral effect of interferon: Proposed mechanism, *J. Int. Res.*, **2**, 75—96.
 163. *Nathan I., Groopman J. E., Quan S. G., Bersch N., Golde D. W.* (1981). Immune(gamma) interferon produced by a human T-lymphoblast cell line, *Nature*, **292**, 842—844.
 164. *Naylor S. L., Sakaguchi A. Y., Shows T. B., Law M. L., Goeddel D. V., Gray P. W.* (1983). Human immune interferon gene is located on chromosome 12, *J. Exp. Med.*, **157**, 1020—1027.
 165. *Neurath A. R., Strick N., Raj N. B. K., Pitha P. M.* (1982). Radioimmunoassay of human beta interferon, *J. Int. Res.*, **2**, 51—57.
 166. *Nilsen T. W., Maroney P. A., Baglioni C.* (1982). Inhibition of protein synthesis in reovirus-infected HeLa cells with elevated levels of interferon induced protein kinase activity, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14593—14596.
 167. *Nilsen T. W., Weissman S. G., Baglioni C.* (1980). Role of 2', 5'-oligo(adenylic acid) polymerase in the degradation of ribonucleic acid linked to double-stranded ribonucleic acid by extracts of interferon-treated cells, *Biochemistry*, **19**, 5574—5579.
 168. *Nilsen T. W., Wood D. L., Baglioni C.* (1981). 2', 5'-Oligo(A)-activated endoribonuclease: Tissue distribution and characterization with a binding assay, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10751—10754.
 169. *Nilsen T. W., Maroney P. A., Robertson H. D., Baglioni C.* (1982). Heterogeneous nuclear RNA promotes synthesis of (2', 5')oligoadenylate and is cleaved by the (2', 5') oligoadenylate-activated endoribonuclease, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 154—160.
 170. *Novick D., Eshhar Z., Gigi O., Marks Z., Revel M., Rubinstein M.* (1983). Affinity chromatography of human fibroblast interferon (IFN- β_1) by monoclonal antibody columns, *J. Gen. Virol.*, **64**, 910—915.
 171. *Ohtsuki K., Torres B. A., Johnson H. M.* (1982). Characterization of immune type interferon (IFN- γ)-induced cytoplasmic protein kinase activity in mouse L cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 422—429.
 172. *Oie H. K., Loh P. C.* (1971). Reovirus type 2: Induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 369—373.
 173. *Oikarinen J.* (1982). Cortisol induces (2'—5')oligoadenylate synthetase in cultured chick embryo tendon fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 876—881.
 174. *Overbach D., Rutter W. J., Shows T. B., Gray P., Goeddel D. V., Lawn R. M.* (1981). Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3123—3127.
 175. *Oxman M. N., Black P. H.* (1966). Inhibition of SV40 T-antigen formation by interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1133—1140.
 176. *Oxman M. N., Baron S., Black P. H., Takemoto K. K., Habel K., Rowe W. P.*

- (1967). The effect of interferon on SV40 T-antigen production in SV40-transformed cells, *Virology*, **32**, 122—127.
177. Pang R. H. L., Hayes T. G., Vilcek J. (1980). Le interferon mRNA from human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5341—5345.
 178. Pfeffer L. M., Landsberger F. R., Tamm I. (1981). Beta-interferon-induced time-dependent changes in the plasma membrane lipid bilayer of cultured cells, *J. Int. Res.*, **1**, 613—620.
 179. Pfeffer L. M., Murphy J. S., Tamm I. (1979). Interferon effects on the growth and division of human fibroblasts, *Exp. Cell Res.*, **121**, 111—120.
 180. Pfeffer L. M., Wang E., Tamm I. (1980). Interferon inhibits the redistribution of cell surface components, *J. Exp. Med.*, **152**, 469—474.
 181. Pfeffer L. M., Wang E., Tamm I. (1981). Interferon effects on microfilament organization, cellular fibronectin distribution, and cell motility in human fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **85**, 9—17.
 182. Pickering L., Lin L. S., Sarkar F. H. (1983). Characteristics of spontaneously produced and of virus-induced human LuKII cell interferons, *Arch. Virol.*, **75**, 201—211.
 183. Pitha P. M., Slate D. L., Raj N. B. K., Ruddle F. H. (1982). Human beta interferon gene localization and expression in somatic cell hybrids, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 564—570.
 184. Pitha P. M., Ciufu D., Kellum M., Raj N. B. K., Reyes G. R., Hayward G. S. (1982). Induction of human beta-interferon synthesis with poly(rI·rC) in mouse cells transfected with cloned cDNA plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4337—4341.
 185. Preble O. T., Black R. J., Friedman R. M., Clippel J. H., Vilcek J. (1982). Systemic lupus erythematosus: Presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon, *Science*, **216**, 429—431.
 186. Ragg H., Weissmann C. (1983). Not more than 117 base pairs of 5'-flanking sequence are required for inducible expression of a human IFN- α gene, *Nature*, **303**, 439—442.
 187. Raj N. B. K., Pitha P. M. (1980). Synthesis of new proteins associated with the induction of interferon in human fibroblasts cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4918—4922.
 188. Raj N. B. K., Pitha P. M. (1981). Analysis of interferon mRNA in human fibroblast cells induced to produce interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7426—7430.
 189. Ratner L., Sen G. C., Brown G. E., Lebleu B., Kawakita M., Cabrer B., Statery E., Lengyel P. (1977). Interferon, double-stranded RNA and RNA degradation: Characteristics of an endonuclease activity, *Eur. J. Biochem.*, **79**, 565—577.
 190. Reem G. H., Cook L. A., Henriksen D. M., Vilsek J. (1982). Gamma interferon induction in human thymocytes activated by lectins and B cell lines, *Infect. Immun.*, **37**, 216—221.
 191. Rehberg E., Kelder B., Hoal E. G., Pestka S. (1982). Specific molecular activities of recombinant and hybrid leukocyte interferons, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11497—11502.
 192. Repik P., Flamand A., Bishop D. H. L. (1974). Effect of interferon upon the primary and secondary transcription of vesicular stomatitis and influenza viruses, *J. Virol.*, **14**, 1169—1178.
 193. Revel M. (1977). Interferon-induced translational regulation, *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 212—220.
 194. Revel M. (1979). Molecular mechanisms involved in the antiviral effects of interferon. In: *Interferon 1979*, Vol. I, ed. by I. Gresser, pp. 101—163, Academic Press, New York.
 195. Riggin C. H., Pitha P. M. (1982). Effect of interferon on the exogenous Friend murine leukemia virus infection, *Virology*, **118**, 202—213.
 196. Robbins C. H., Kramer G., Saneto R., Hardesty D., Johnson H. M. (1981).

- Association of protein kinase activity and the induction of the antiviral state in a cell line responsible to the antiviral effects of interferon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 103—110.
197. *Roberts W. K., Vasil A.* (1982). Evidence for the identity of murine gamma interferon and macrophage activating factor, *J. Int. Res.*, **2**, 519—532.
 198. *Roberts W. K., Hovanessian A., Brown R. E., Clemens M. J., Kerr I. M.* (1976). Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis, *Nature*, **264**, 477—480.
 199. *Rochette-Egly C., Tovey M. G.* (1982). Interferon enhances guanylate cyclase activity in human lymphoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 150—156.
 200. *Rubin B. Y., Gupta S. L.* (1980). Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5928—5932.
 201. *Rubin B. Y., Gupta S. L.* (1980). Interferon-induced proteins in human fibroblasts and development of the antiviral state, *J. Virol.*, **34**, 446—454.
 202. *Rubinstein M.* (1982). The structure of human interferons, *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 5—16.
 203. *Sagar A. D., Sehgal P. B., Slate D. L., Ruddle F. H.* (1982). Multiple human beta interferon genes, *J. Exp. Med.*, **156**, 744—755.
 204. *Samuel E. C.* (1979). Mechanism of interferon action: Phosphorylation of protein synthesis initiation factor eIF-2 in interferon-treated human cells by a ribosome-associated protein kinase possessing site specificity similar to hemin-regulated rabbit reticulocyte kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 600—604.
 205. *Samuel C. E., Farris D. A.* (1977). Mechanism of interferon action: Species specificity of interferon and of the interferon-mediated inhibitor of translation from mouse, monkey, and human cells, *Virology*, **77**, 556—565.
 206. *Samuel C. E., Joklik W. K.* (1974). A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNAs, *Virology*, **58**, 476—491.
 207. *Samuel C. E., Knutson G. S.* (1981). Mechanism of interferon action: Cloned human leukocyte interferons induce protein kinase and inhibit vesicular stomatitis virus but not reovirus replication in human amnion cells, *Virology*, **114**, 302—306.
 208. *Samuel C. E., Knutson G. S.* (1982). Mechanism of interferon action: Kinetics of the induction of the antiviral state and protein phosphorylation in mouse fibroblasts treated with natural and cloned interferons, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11791—11795.
 209. *Schmidt A., Chernajovsky Y., Schulman L., Federman P., Berissi H., Revel M.* (1979). An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'—5') oligoadenylate and the C-C-A terminus of tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4788—4792.
 210. *Secher D. S., Burke D. C.* (1980). A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon, *Nature*, **285**, 446—450.
 211. *Sehgal P. B.* (1982). The interferon genes, *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 17—33.
 212. *Sehgal P. B., Gupta S. L.* (1980). Regulation of the stability of poly(I)·poly(C)-induced human fibroblast interferon mRNA: Selective inactivation of interferon mRNA and lack of involvement of 2', 5'-oligo(A) synthetase activation in the shutoff of interferon production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3489—3493.
 213. *Sehgal P. B., Dobberstein B., Tamm I.* (1977). Interferon messenger RNA content of human fibroblasts during induction, shutoff, and superinduction of interferon production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3409—3413.
 214. *Sehgal P. B., Lynes D. S., Tamm I.* (1978). Superinduction of human fibro-

- blast interferon production: Further evidence for increased stability of interferon mRNA, *Virology*, **89**, 186—198.
215. *Sehgal I. B., Pfeffer L. M., Tamm I.* (1982). Interferon and its inducers. In: *Chemotherapy of Viral Infections*, ed. by P. E. Came and L. A. Caligiuri, pp. 205—311, Springer Verlag, Berlin.
 216. *Sehgal P. B., May L. T., Sagar A. D., LaForge K. S., Inouyé M.* (1983). Isolation of novel human genomic DNA clones related to human interferon- β cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3632—3636.
 217. *Sekellick M. J., Marcus P. I.* (1980). The interferon system as a regulator of persistent infection, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **350**, 545—557.
 218. *Sekellick M. J., Marcus P. I.* (1982). Interferon induction by viruses: VIII. Vesicular stomatitis virus: (\pm) DI-011 particles induce interferon in the absence of standard virions, *Virology*, **117**, 280—285.
 219. *Shimizu F., Ohmoto Y., Imagawa K.* (1981). Production of anti-IFN- β sera with chemically synthetic IFN- β peptide fragment (1—13), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1149—1156.
 220. *Siegal G. P., Thorgeirsson U. P., Russo R. G., Wallace D. M., Liotta L. A., Berger S. L.* (1982). Interferon enhancement of the invasive capacity of Ewing sarcoma cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4064—4068.
 221. *Silverman R. H., Skehel J. J., James T. C., Wreschner D. H., Kerr I. M.* (1983). rRNA cleavage as an index of ppp(A2'p) $_n$ A activity in interferon-treated encephalomyocarditis virus-infected cells, *J. Virol.*, **46**, 1051—1055.
 222. *Slate D. L., Ruddle F. H.* (1981). Genetic control of the interferon system. In: *Interferon 1981*, Vol. 3, ed. by I. Gresser, pp. 65—76, Academic Press, London.
 223. *Slattery E., Gosh N., Samanta H., Lengyel P.* (1979). Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: Activation of an endonuclease by (2'—5')A $_n$. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4778—4782.
 224. *Slocumbe P., Easton A., Boseley P., Burke D. C.* (1982). High-level expression of an interferon $\alpha 2$ gene cloned in phage M13 mp7 and subsequent purification with a monoclonal antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5455—5459.
 - 224a. *Smoth G. E., Summers M. D., Fraser M. J.* (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a Baculovirus expression vector, *Molec. Cell. Biol.*, **3**, 2156—2165.
 225. *St. Laurent G., Yoshie O., Floyd-Smith G., Samanta H., Sehgal P. B., Lengyel P.* (1983). Interferon action: Two (2'—5')(A) $_n$ synthetases specified by distinct mRNAs in Ehrlich ascites tumor cells treated with interferon, *Cell*, **33**, 95—102.
 226. *Staehelin T., Durrer B., Schmidt J., Takacs B., Stocker J., Miggiano V., Stahl C., Rubinstein M., Levy W. P., Hersherg R., Pestka S.* (1981). Production of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the human leukocyte interferons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1848—1852.
 227. *Stewart W. E., II, De Clercq E. D., De Somer P.* (1974). Stabilization of interferons by "defensive" reversible denaturation, *Nature*, **249**, 460—461.
 228. *Stewart W. E., II, Dresser I., Tovey M. G., Bandu M.-T., Le Goff S.* (1976). Identification of the cell multiplication inhibitory factors in interferon preparations as interferons, *Nature*, **262**, 300—302.
 229. *Strander H.* (1977). Interferons: Anti-neoplastic drugs? *Blut*, **35**, 277—288.
 230. *Streuli M., Hall A., Boll W., Stewart W. E., II, Nagata S., Weissmann C.* (1981). Target cell specificity of two species of human interferon produced in *Escherichia coli* and of hybrid molecules derived from them, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2848—2852.
 231. *Strube W., Strube M., Kroath H., Jungwirth C., Bodo G., Graf T.* (1982). Interferon inhibits establishment of fibroblast interferon with avian retroviruses, *J. Int. Res.*, **2**, 37—49.
 232. *Szigeti R., Masucci M. G., Masucci G., Klein G.* (1980). Interferon suppres-

- ses antigen- and mitogen-induced leukocyte migration inhibition, *Nature*, **288**, 594—596.
233. Tanaka S., Oshima T., Ohsuye K., Ono T., Mizono A., Ueno A., Nakazato H., Tsujimoto M., Higashi N., Noguchi T. (1983). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized gene for the human immune interferon, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1707—1723.
 234. Taniguchi T., Sakai M., Fujii-Kuriyama Y., Muramatsu M., Kobayashi S., Sudo T. (1979). Construction and identification of a bacterial plasmid containing the human fibroblast gene sequence, *Proc. Jpn. Acad. [Ser. B]*, **55**, 464—469.
 235. Taniguchi T., Guarente L., Roberts T. M., Kimelman D., Douhan J., III, Ptashne M. (1980). Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5230—5233.
 236. Tavernier J., Derynck R., Fiers W. (1981). Evidence for a unique human fibroblast interferon (IFN- β) chromosomal gene, devoid of intervening sequences, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 461—471.
 237. Tavernier J., Gheysen D., Derynck F., Van der Heyden J., Fiers W. (1983). Deletion mapping of the inducible promoter of human IFN- β gene, *Nature*, **301**, 634—636.
 238. Laylor J. (1964). Inhibition of interferon action by actinomycin D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 447—451.
 239. Taylor-Papadimitriou J., Balkwill F. R. (1982). Implications for clinical application of new developments in interferon research, *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 49—67.
 240. Tiensiwakul P., Khoobyarian N. (1983). Adenovirus fiber protein produces synthesis of interferon in mouse spleen and macrophage cultures, *Intervirology*, **20**, 52—55.
 241. Todaro G. J., Green H. (1966). High frequency of SV40 transformation of mouse cell line 3T3, *Virology*, **28**, 756—759.
 242. Tomita Y., Kuwata T. (1981). Suppressive effects of interferon on cell fusion by Sendai virus, *J. Gen. Virol.*, **55**, 289—295.
 243. Tomita M., Yamamoto Y., Hozumi M. (1980). Stimulation by interferon of induction of differentiation of mouse myeloid leukemic cells, *Cancer Res.*, **40**, 2919—2924.
 244. Tomita Y., Nishimaki J., Takahashi F., Kuwata T. (1982). Human interferon suppression of retrovirus production and cell fusion, and failure to inhibit replication of encephalomyocarditis virus in rhabdomyosarcoma (RD114) cells, *Virology*, **120**, 258—263.
 245. Tovell D., Cantell K. (1971). Kinetics of interferon production in human leukocyte suspensions, *J. Gen. Virol.*, **13**, 485—489.
 246. Tovey M. G., Rochette-Egly C. (1981). Rapid increase in guanosine 3', 5'-cyclic-monophosphate in interferon-treated mouse leukemia L 1210 cells: Relationship to the development of the antiviral state and inhibition of cell multiplication, *Virology*, **115**, 272—281.
 247. Tovey M. G., Dron M., Gresser I. (1982). Interferon enhances the expression of Epstein-Barr virus early antigen in Daudi cells, *J. Gen. Virol.*, **60**, 31—38.
 248. Trent J. M., Olson S., Lawn R. M. (1982). Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7809—7813.
 249. Ulrich A., Gray A., Goeddel D. V., Dull T. J. (1982). Nucleotide sequence of a portion of human chromosome 9 containing a leukocyte interferon gene cluster, *J. Mol. Biol.*, **156**, 467—486.
 250. Vandenbussche E. P., Kuwata T., Verhaegen-Lewalle M., Content J. (1983). Effect of interferon action on two human choriocarcinoma-derived cell lines, *Virology*, **128**, 474—479.
 251. Vaquero C., Sanceau J., Falcoff R. (1982). Protein synthesis in extracts

- from interferon-treated mengo virus infected cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 974—980.
252. *Vengris V. E., Stollar B. D., Pitha P. M.* (1975). Interferon externalization by producing cell before induction of antiviral state, *Virology*, **65**, 410—417.
 253. *Verhaegen M., Divizia M., Vandenbussche P., Kuwata T., Content J.* (1980). Abnormal behavior of interferon-induced enzymatic activities in an interferon-resistant cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4479—4483.
 254. *Verhaegen-Lewalle M., Kuwata T., Zhang Z.-X., De Clercq E., Cantell K., Content J.* (1982). 2—5A synthetase activity induced by interferon α , β and γ in human cell lines differing in their sensitivity to the anticellular and antiviral activities of these interferons, *Virology*, **117**, 425—434.
 255. *Vilcek J., Gresser I., Merigan T. C., eds.* (1979). *Regulatory Functions of Interferons*, New York Academy of Sciences, New York.
 256. *Vilcek J., Rossman T. G., Varacalli F.* (1969). Differential effects of actinomycin D and puromycin on the release of interferon induced by double-stranded RNA, *Nature*, **222**, 682—683.
 257. *Wagner R. R.* (1964). Inhibition of interferon biosynthesis by actinomycin D, *Nature*, **204**, 49—51.
 258. *Wallach D., Fellous M., Revel M.* (1982). Preferential effect of gamma interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells, *Nature*, **299**, 833—836.
 259. *Wang E., Pfeffer L. M., Tamm I.* (1981). Interferon increases the abundance of submembranous microfilaments in HeLa-S₃ cells in suspension culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6281—6285.
 260. *Weck P. K., Apperson S., May L., Stebbing N.* (1981). Comparison of the antiviral activities of various cloned human interferon-alpha subtypes in mammalian cell cultures, *J. Gen. Virol.*, **57**, 233—237.
 261. *Weck P. K., Rinderknecht E., Estell D. A., Stebbing N.* (1982). Antiviral activity of bacteria-derived human alpha interferons against encephalomyocarditis virus infection of mice, *Infect. Immun.*, **35**, 660—665.
 262. *Weck P. K., Apperson S., Stebbing N., Gray P. W., Leung D., Shepard H. M., Goeddel D. V.* (1981). Antiviral activities of hybrids of two major human leukocyte interferons, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6153—6160.
 263. *Weidle U., Weissmann C.* (1983). The 5' flanking region of a human IFN- α gene mediates viral induction of transcription, *Nature*, **303**, 442—446.
 264. *Weil J., Epstein C. J., Epstein L. B., Sedmak J., Sabran J. L., Grossberg S. E.* (1983). A unique set of polypeptides is induced by interferon γ in addition to those induced in common with α and β interferons, *Nature*, **301**, 437—439.
 265. *Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M., Shulman L., Soreq H., Nir U., Wallach D., Perricaudet M., Tiollais P., Revel M.* (1980). Two interferon mRNAs in human fibroblasts: In vitro translation and *Escherichia coli* cloning studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7152—7156.
 266. *Whitaker-Dowling P. A., Wilcox D. K., Widnell C. C., Youngner J. S.* (1983). Interferon-mediated inhibition of virus penetration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1083—1086.
 267. *Whitman J. E., Crowley G. M., Tou J., Tredway J. V., Hung C. L.* (1981). Purification of human lymphoblastoid cell-derived interferon α by controlled pore glass bead absorption chromatography, *J. Int. Res.*, **1**, 305—314.
 268. *Wiebe M. E., Joklik W. K.* (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon, *Virology*, **66**, 229—240.
 269. *Wilkinson M., Morris A.* (1983). Interferon with novel characteristics produced by human mononuclear leukocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111**, 498—503.
 270. *Wilson V., Jeffreys A. J., Barrie T. A.* (1983). A comparison of vertebrate

- gene families detected by hybridization with human interferon DNA, *J. Mol. Biol.*, **166**, 457—475.
271. *Winship T. R., Marcus P. I.* (1980). Interferon induction by viruses: VI, Reo-virus: Virion genome dsRNA as the interferon inducer in aged chick embryo cells, *J. Int. Res.*, **1**, 155—167.
 272. *Wiranowska-Stewart M., Stewart W. E., II* (1977). The role of human chromosome 21 in sensitivity to interferons, *J. Gen. Virol.*, **37**, 629—633.
 273. *Wiranowska-Stewart M., Stewart W. E., II* (1981). Determination of human leukocyte populations involved in production of interferons alpha and gamma, *J. Int. Res.*, **1**, 233—244.
 274. *Yakobson E., Prives C., Hartman J. R., Winocour E., Revel M.* (1977). Inhibition of viral protein synthesis in monkey cells treated with interferon late in simian virus 40 lytic cycle, *Cell*, **12**, 73—81.
 275. *Yakobson E., Revel M., Winocour E.* (1977). Inhibition of simian virus 40 replication by interferon treatment late in the lytic cycle, *Virology*, **80**, 225—228.
 276. *Yamamoto K., Ymaguchi N., Oda K.* (1975). Mechanism of interferon-induced inhibition of early simian virus 40 (SV40) functions, *Virology*, **68**, 58—70.
 277. *Yang K., Samanta H., Dougherty J., Jayaram B., Broeze R., Lengyel P.* (1981). Interferons, double-stranded RNA, and RNA degradation: Isolation and characterization of homogeneous human (2'—5') (A)_n synthetase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 9324—9328.
 278. *Yelverton E., Leung D., Weck P., Gray P. W., Goeddel D. V.* (1981). Bacterial synthesis of a novel human leukocyte interferon, *Nucleic Acid Res.*, **9**, 731—741.
 279. *Yipp Y. K., Barrowclough B. S., Urban C., Vilcek J.* (1982). Purification of two subspecies of human γ (immune) interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1820—1824.
 280. *Youngner J. S., Scott A. W., Hallum J. V., Steinbring W. R.* (1966). Interferon production by inactivated Newcastle disease virus in cell cultures and in mice, *J. Bacteriol.*, **92**, 862—868.
 281. *Ziegler R. E., Joklik W. K.* (1981). Effect of interferon on multiplication of avian sarcoma virus B77 in duck embryo fibroblasts, *J. Int. Res.*, **1**, 521—538.
 282. *Zilberstein A., Kimchi A., Schmidt A., Revel M.* (1978). Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: A protein kinase and an oligoadenylate synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4734—4738.
 283. *Zinn K., Mellon P., Ptashne M., Maniatis T.* (1982). Regulated expression of an extrachromosomal human β -interferon gene in mouse cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4897—4901.

Противовирусная химиотерапия

*Сунвен Чу, Томас Мериган*¹

За последние три десятилетия было предложено множество препаратов для лечения вирусных болезней. Однако в прошлом из-за отсутствия правильной оценки естественного развития большинства вирусных инфекций бесконтрольные терапевтические испытания часто вели к ошибочным заключениям. В последнее время в результате разработки и использования лабораторных методов специфической вирусной диагностики, расширения биохимических знаний о процессах репликации вирусов, а также лучшего понимания естественной истории вирусной инфекции в специфических популяциях клеток хозяев в этом вопросе заметно быстрое продвижение вперед.

Доклиническая оценка противовирусных препаратов

Механизмы противовирусного действия

Расширение знаний в области биохимии репликации вирусов привело к тому, что несостоятельность идеи о невозможности специфической противовирусной терапии (поскольку хозяину и вирусу присущи общие биохимические процессы) стала очевидной. В настоящее время известны противовирусные вещества, избирательно интерферирующие с вирус-специфическими функциями или взаимодействующие с вирус-специфическими ферментами. Например, недавно привлекли внимание несколько препаратов, которые превращаются в активную форму тимидинкиназой, кодируемой вирусом герпеса. В принципе противовирусная активность может быть направлена на любую из последова-

¹ *Sunwen Chou, Thomas C. Merigan*, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305.

Таблица 16.1. Механизм действия противовирусных препаратов

Фазы репродукции вируса	Ингибитор
Раздевание	Амантадин Арилдон
Транскрипция	Рибавирин
Трансляция	Интерферон
Синтез ДНК	Аналоги нуклеозидов (например, видарабин, ацикловир) Фосфономуравьиная кислота
Сборка	2-Дезокси-D-глюкоза

тельных стадий репликации вируса: адсорбцию, проникновение, раздевание, транскрипцию, трансляцию, репликацию генома, сборку вириона и созревание. Примеры веществ, действующих на этой стадии, приведены в табл. 16.1.

Определение противовирусной активности *in vitro*

Прямой корреляции противовирусной активности вещества *in vitro* с клинической эффективностью ожидать не приходится, поскольку условия репликации вируса при взаимодействии вирус — хозяин во время болезни сильно отличаются от условий *in vitro*. Результаты измерения противовирусной активности *in vitro* зависят от клеток хозяина, среды, используемой для поддержания зараженной вирусом культуры, а также дозы и свойств вводимого вирусного материала. Многие вещества, обладающие противовирусным действием *in vitro*, нельзя использовать в клинике из-за того, что они являются антиметаболитами, токсичными не только для вирусов, но и для клеток хозяина. Применимые в клинике противовирусные вещества должны обладать необходимым свойством — легко проявлять свое действие в опытах *in vitro*, которые представляют собой первую ступень в оценке кандидатов в противовирусные препараты. В первом приближении вирус-ингибирующую активность можно количественно оценить, измеряя концентрацию препарата, необходимую для уменьшения образования инфекционных вирусных частиц на определенный процент — как правило, на 50%. В настоящее время вопрос о полном устранении вируса не стоит, потому что доступные препараты не подавляют полностью репликацию вирусов.

Модели для испытания противовирусных препаратов на животных

Модели с использованием животных незаменимы для доклинической оценки противовирусных веществ, поскольку они обеспечивают точный подбор экспериментальных условий. Однако некоторые имеющие большое значение вирусы человека (например, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр, вирус гепатита В) не вызывают заболеваний у обычных лабораторных животных. В этих случаях значительный интерес представляют родственные вирусы животных, вызывающие сходные заболевания у соответствующих хозяев. Испытания на животных весьма продуктивны в исследовании противовирусных веществ, направленных против вируса простого герпеса (HSV), так как он вирулентен для различных лабораторных животных. Особенно полезна модель герпетического кератита у кролика. Широко используются также герпетическая инфекция бесшерстных (голых) мышей и экспериментальный энцефалит, вызываемый внутримозговым введением HSV. Интересны также модели, предложенные для лабиального и генитального герпеса. Исследования на животных иногда полезны для предсказания клинической эффективности препаратов. Например, на модели вызванного HSV энцефалита мышей идоксуридин (иоддезоксисуридин) был не эффективен, в то время как видарабин и ацикловир дали положительный эффект. Клиническая эффективность местного глазного применения противогерпетических веществ строго соответствовала той, которая обнаруживалась у кролика. К сожалению, до настоящего времени удовлетворительная модель, воспроизводящая латентность и реактивацию HSV у человека, не разработана. Модели с использованием животных позволяют делать выводы о токсичности применяемых веществ, благодаря чему многие препараты были забракованы для клиники. Однако из-за особенностей метаболизма у разных видов некоторые препараты (например, видарабин) оказались токсичными для человека, хотя этого нельзя было предсказать на основании опытов на животных.

Факторы, влияющие на естественное развитие вирусных инфекций

Вирус

Наряду с межвидовыми различиями вирусов по вирулентности и спектру вызываемых ими заболеваний существуют также различия внутри видов, между штаммами и подтипами вирусов. Наиболее четко это иллюстрируется на примере HSV, типы 1 и 2 которого вызывают несколько различающиеся клиниче-

ские синдромы (например, тип 1 — некротизирующий энцефалит, а тип 2 — асептический менингит); тенденции к рецидивам у этих типов также различны [157]. В связи с развитием противовирусной терапии точность в диагностике приобрела еще большее значение. При противовирусных испытаниях клинический диагноз должен быть также подтвержден вирусологически, так как синдромы, вызываемые различными вирусами, могут иметь сходные черты.

Хозяин

Несмотря на успехи в изучении иммунного ответа хозяина на вирусную инфекцию, несовершенство нашего знания участвующих в инфекции факторов осложняет интерпретацию результатов при изучении противовирусных препаратов даже в опытах, поставленных по схеме с соответствующими контролями и случайной выборкой. В прошлом важную информацию в этой области получали при испытаниях, в которых имелись соответствующие контроли. Например, происхождение заболевания генитальным герпесом зависит от прошлого контакта хозяина с HSV-1 или HSV-2, которые можно определить серологически. Тяжесть течения ветрянки или опоясывающего лишая зависит от степени угнетения иммунной системы хозяина; это состояние еще не удается охарактеризовать количественно, однако дефицит гуморального и клеточного иммунитета можно продемонстрировать *in vitro*. Контроль угнетения иммунитета довольно затруднителен при исследовании гетерогенной популяции больных; проблема упрощается, если больные в прошлом перенесли одинаковые заболевания и подвергаются одинаковому режиму угнетения иммунитета. Время применения противовирусной терапии также важно; при генитальном герпесе или при опоясывающем лишае раннее начало лечения имеет критическое значение для демонстрации значительного противовирусного эффекта, так как через короткое время начинают действовать защитные механизмы хозяина и на их фоне труднее выявляется эффект препарата. К тому моменту, когда происходит повреждение ткани, репликация вируса часто снижается. Кроме того, повреждения ткани могут вызываться суперинфекцией, воздействием других патогенных агентов или иммунными механизмами, и в этом случае противовирусная терапия неэффективна.

Клиническая противовирусная терапия

Специфическая диагностика

Имеющиеся в обращении противовирусные вещества достоверно улучшают течение только ограниченного числа вирусных

инфекций, и при этом все они обладают значительной токсичностью. Если предполагают проводить противовирусную терапию, диагноз вирусной инфекции, поставленный на основе клинических данных, следует подтвердить лабораторными методами: культивированием вируса или выявлением вирусного антигена или нуклеиновой кислоты с помощью иммунологических реагентов или проб на нуклеиновую кислоту. Все растущая доступность быстрых лабораторных методов облегчает идентификацию вирусов и обследование больных. При раннем определении вирусной инфекции, серологический анализ, как правило, менее полезен, хотя иногда наличие специфических антител некоторых видов, таких как IgM, позволяет предположить текущую или недавнюю инфекцию.

Предположительный эффект и риск

Применение противовирусной терапии в различных клинических ситуациях зависит от ряда факторов. К ним относятся естественное течение нелеченой болезни, наличие достоверно эффективной терапии, возможность доставить соответствующий препарат к месту инфекции, кратковременная и долгосрочная токсичность вещества, а также возможность возникновения устойчивых к препарату мутантов вируса.

Совершенно очевидно, что необходимость терапии существенно зависит от характера протекания нелеченой болезни. Так как это в свою очередь зависит от вирусных и хозяйских факторов, важно знать детали болезни, а также иметь клинические и лабораторные данные. Недостаточно обоснованное и рискованное вмешательство можно оправдать при симптомах бешенства, тогда как при риновирусной инфекции неприемлем даже небольшой неблагоприятный эффект. При инфекциях, вызванных HSV или вирусом ветрянки-опоясывающего лишая (*varicella zoster virus*, VZV), при которых в настоящее время доступна противовирусная терапия, положительный эффект в обычной практике обнаруживается у относительно небольшой части больных. Вместе с тем в медицинских центрах, где больные с неоплазией или трансплантированными органами получают иммуносупрессивные вещества, возможность использования противовирусных препаратов при этих инфекциях значительно возрастает.

Наиболее удовлетворительные сведения об эффективности специфического противовирусного лечения получают в контролируемых испытаниях со случайной выборкой. Обычно в такую выборку входит популяция больных, которых лечили на одной и той же стадии болезни. Результаты подобных испытаний часто невозможно расширить за пределы специфических клинических ситуаций. Например, в настоящее время нет подтвержден-

ных соответствующими контролями клинических данных, которые могли бы предсказать исход лечения кожной или висцеральной диссеминированной формы опоясывающего лишая через 3—7 дней после появления локальных поражений кожи, хотя в подобных случаях часто требуется клиническое заключение. Результаты, полученные в опытах без соответствующих контролей, являются необходимой предварительной ступенью перед испытаниями с контролями, но они никогда не могут служить надежной основой для правильного терапевтического решения. В качестве примеров препаратов и методов, получивших широкое признание, но впоследствии, после испытаний с контролями, признанных токсичными или неудовлетворительными соответственно, можно назвать системное применение идоксуридина для лечения энцефалита, вызываемого HSV [23], цитарабин, применявшийся при диссеминированном опоясывающем лишае у больных раком [192], и фотодинамическую инактивацию, которую использовали при рекуррентных инфекциях, вызываемых HSV [137].

На эффективность лечения может влиять фармакокинетика данного препарата. Например, видарабин (или его монофосфат) плохо усваивается при введении через рот и не способен проникать в глубокие слои кожи, где происходит репликация вируса. Фибробластный интерферон при внутримышечном введении может не достигать измеряемых концентраций в крови. При подобных неблагоприятных условиях противовирусная терапия может быть неэффективной.

Поскольку доступные в настоящее время противовирусные вещества могут обладать кратковременной или длительной токсичностью, при работе с ними в клинике необходимо соблюдать осторожность. Вероятность выявления токсического эффекта новых препаратов с течением времени увеличивается. Например, хотя видарабин относительно нетоксичен в экспериментах, контролируемых короткое время, в определенных условиях он проявляет нейротоксичность. Еще большие опасения вызывает поздний неблагоприятный эффект противовирусных препаратов, подавляющих синтез ДНК или белка. Опыт, накопленный к настоящему времени на людях, еще мал; вместе с тем проверка ряда препаратов на мутагенез *in vitro*, а также испытания их на животных на тератогенность и канцерогенность в нескольких случаях дали положительные результаты, отмеченные ниже. Отсюда следует, что во время беременности благоразумнее избегать противовирусной терапии, за исключением ситуаций с необычайно высоким риском.

По аналогии с антибактериальными веществами не исключено появление устойчивости вирусов к противовирусным препаратам. Устойчивые к препарату мутанты регулярно выделяют при пассировании вируса в присутствии противовирусного ве-

щества. В случае применения аналогов нуклеозидов за проявление устойчивости обычно ответственны мутации в генах вирусной тимидинкиназы или ДНК-полимеразы. При противовирусной терапии, например, этим объясняются неудачи в применении идоксуридина при кератитах, вызванных HSV. Хотя некоторые эксперименты позволяют предположить, что устойчивые к ацикловиру мутанты HSV менее патогенны для животных и с меньшей вероятностью вызывают у них латентную инфекцию, накопленный клинический опыт недостаточен, для того чтобы переносить эти данные на человека.

Имеющиеся в настоящее время разрешенные противовирусные препараты

Разрешенные противовирусные препараты перечислены в табл. 16.2. Со временем утвержденные показания для этих препаратов изменились, и, вероятно, будут продолжать меняться.

Таблица 16.2. Разрешенные в настоящее время противовирусные препараты

Препарат	Торговое название	Введение	Показания
Ацикловир	Зовиракс	Местное и внутривенное	Герпетическая инфекция слизистых и кожи у иммунодефицитных хозяев
Амантадин	Симметрель	Пероральное	Начальная стадия заражения вирусом генитального герпеса Профилактика и лечение гриппа А
Идоксуридин	Стоксил	Местное	Герпетический кератит
Трифлюридин	Герплекс	»	То же
Видарабин	Вироптик	»	» »
	Вира-А	Внутривенное	Герпетический энцефалит Герпетическое поражение ЦНС и диссеминированная инфекция новорожденных

Амантадин был первоначально разрешен только для азиатского гриппа (H2N2), но сейчас он утвержден для профилактики и раннего лечения заболеваний, вызываемых всеми вирусами гриппа А. Системное применение видарабина было недавно утверждено для лечения неонатальной диссеминации и инфицирования центральной нервной системы HSV. В следующих разделах мы детально рассмотрим несколько представляющих интерес современных противовирусных веществ.

Видарабин (аденинарабинозид)

Первоначально синтезированный в поисках противораковых веществ нуклеозидный аналог видарабин был позднее выделен как естественный продукт в фильтрате культуры *Streptomyces antibioticus*. В связи с тем, что в опытах *in vitro* его антигерпетический противовирусный эффект проявляется в концентрациях, относительно нетоксичных для клеток хозяина, в течение последних пятнадцати лет он был интенсивно изучен.

Противовирусная активность *in vitro* [175]

Кроме действия на герпесвирусы человека (HSV-1 и HSV-2, а также VZV, CMV и EBV) видарабин угнетает некоторые герпесвирусы животных, поксвирусы, ретровирусы и рабдовирусы [42]. Испытание чувствительности вирусов к видарабину осложняется не только обычными факторами: дозой вирусного инокулята и клеточной системой хозяина, но также быстротой, с которой видарабин превращается в арабинозилгипоксантин в клетках хозяина под действием фермента аденозиндезаминазы. Противовирусный механизм действия видарабина известен не полностью; вероятно, он основан на фосфорилировании препарата в клетках хозяина до моно- и трифосфатпроизводных, которые могут подавлять синтез вирусной ДНК путем дифференцированного угнетения вирус-специфических ферментов (таких как ДНК-полимераза) или терминации синтеза цепи ДНК. Из популяций вируса дикого типа легко выделяются мутанты HSV, устойчивые к видарабину *in vitro*. У большинства этих мутантов, устойчивых также к фосфоноуксусной кислоте, изменен локус гена ДНК-полимеразы [38].

Противовирусная активность *in vivo* [181]

На модели кератита, вызываемого HSV у кролика, местное применение видарабина при лечении поверхностных поражений дает равнозначные или даже лучшие результаты, чем идоксуридин [91]. На частоту рецидивов препарат не действует. Кожные заболевания человека не моделируются адекватным образом на животных, однако на бесшерстных мышах показано, что видарабин уменьшает образование вызываемых HSV поражений, а также смертность при моделировании на них инфекции ЦНС и диссеминированного поражения кожи [99]. Интересно, что идоксуридин также проявляет противовирусную активность на этой модели. При системном применении видарабина смертность мышей, которым интрацеребрально инокулировали HSV, значительно уменьшалась, если препарат вводили в пределах 4-х дней

после инокуляции, причем выживаемость животных коррелировала со сроком введения, т. е. она была выше при более раннем введении препарата. Противовирусная активность видарабина показана как для HSV-1, так и для HSV-2. Видарабин проявляет также некоторую активность *in vivo* против вируса осповакцины у кроликов с осповакцинным кератитом [86] или с поражениями кожи, а также у мышей с осповакцинным энцефалитом. Несмотря на проявляемую *in vitro* активность видарабина против вируса бешенства, на мышах терапевтического эффекта препарата против бешенства не наблюдалось [75].

Доклиническая токсикология [106, 107]

При пероральном введении мыши проявляют толерантность к видарабину в дозе $170 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ в течение 28 дней; в этот период отмечена лишь некоторая дисфункция печени и атрофия гонад. После отмены препарата наблюдалось постепенное восстановление состояния животных. У собак при внутримышечном введении $50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ в месте введения препарата были обнаружены мышечные воспаления и некрозы. Макаки-резусы переносили $15 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ препарата при внутривенном введении в течение 28 дней без видимых признаков токсичности, но при внутримышечном введении препарата в дозе от 25 до $75 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ у них развивался тремор, слабость, сонливость, некрозы мышц, появлялись расстройства координации и нерегулярные судороги.

Видарабин обладает мутагенным действием в отношении линии клеток L5178. В культуре лимфоцитов человека он вызывает также разрывы хромосом. Видарабин тератогенен для кроликов в дозе $5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ при системном и местном введении. У мышей и крыс, получавших от 30 до $50 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ видарабина внутримышечно, наблюдалась статистически достоверная индукция опухолей по сравнению с контрольными животными. Как свидетельствуют доклинические исследования, видарабин обладает подострой и долговременной токсичностью, и поэтому его можно применять системно только при вирусологически идентифицированных тяжелых заболеваниях.

Клиническая фармакология [98]

Видарабин доступен в клинике в виде 3%-ного препарата для местного применения, а также препарата для внутривенного введения. Из-за низкой растворимости в воде — $0,45 \text{ мг/мл}$ при 25°C — видарабин можно использовать только в разведенных растворах и только при медленном внутривенном введении. Это осложняет лечение больных с повышенным внутричерепным дав-

лением, которое регистрируется при энцефалите, вызываемом HSV. Видарабин — монофосфат значительно более растворим в воде, и его можно вводить внутримышечно [222]. Измерения видарабина и определение корреляции его уровня в крови с противовирусным эффектом осложняются его быстрым обменом. Широко распространенный в эритроцитах и других клетках фермент аденозиндезаминаза превращает видарабин в арабинозил-гипоксантин (Ага-Нх), который обладает слабой противовирусной активностью *in vitro*. При внутривенном введении 10—20 мг/кг видарабина через 12 часов его уровень в плазме едва определяется, несмотря на добавление в пробирки с пробами ингибитора аденозиндезаминазы. При введении видарабина в дозе 10 мг/кг максимальное содержание Ага-Нх достигает 3—6 мкг/мл, а период его полужизни в плазме составляет 3,5 ч. Продукты распада выводятся главным образом через почки; при нарушении их работы концентрация продуктов распада значительно увеличивается. Концентрация Ага-Нх в спинномозговой жидкости составляет около одной трети его концентрации в плазме. Не исключено, что наблюдаемую токсичность препарата обуславливают дополнительные метаболиты видарабина, которые еще плохо изучены. Видарабин быстро дезаминируется в желудочно-кишечном тракте и плохо усваивается при пероральном введении.

Во время клинических испытаний на больных с герпетическими энцефалитами, а также ветрянкой и опоясывающим лишаем видарабин показал относительно низкую острую токсичность, проявляющуюся главным образом в виде желудочно-кишечных симптомов, причем частота этих симптомов у представителей опытной и контрольной групп значительно не различалась. Однако в дальнейшем выявилась неврологическая токсичность видарабина, выражающаяся в болезненных парестезиях, треморе, атаксии, спутанности сознания или психозе [120, 130, 160, 209]. Чаще это проявляется у лиц с дисфункцией печени и почек, а также у тех, которых лечили видарабином в комбинации с интерфероном [130, 160]. Лечение видарабином иногда вызывает снижение лейкоцитов или тромбоцитов, но их содержание восстанавливается через 2—3 нед после лечения.

Клинические испытания [98]

Наиболее ценные клинические данные по видарабину получены в клинических испытаниях с контрольными группами, получавшими плацебо, и случайной выборкой. Они суммированы в табл. 16.3.

Таблица 16.3. Клинические испытания видарабина с соответствующими контролями

Заболевание	Введение	Результаты лечения	Источник данных
Герпетические кератиты	3%-ная мазь, местное	Время заживления такое же или меньше, чем при использовании идоксуридина	[145]
Герпетические энцефалиты	15 мг·кг ⁻¹ ·сут ⁻¹ , в/в, 10 дней	Смертность на 30-й день уменьшилась с 70% до 28%; смертность через год — 40%; тяжелые остаточные поражения у выживших	[221]
Поражение ЦНС и диссеминированная инфекция у новорожденных	15 мг·кг ⁻¹ ·сут ⁻¹ , в/в, 10 дней	Смертность уменьшилась, тяжелые остаточные поражения у выживших	[217]
Ветрянка у иммунодефицитных больных	10 мг·кг ⁻¹ ·сут ⁻¹ , в/в, 5 дней	Снижение формирования новых поражений и висцеральной диссеминации	[220]
Опоясывающий лишай у иммунодефицитных больных	10 мг·кг ⁻¹ ·сут ⁻¹ , в/в, 5 дней	Снижение формирования новых поражений; меньше кожных и висцеральных диссеминаций; уменьшение продолжительности постгерпетической невралгии	[218]
Герпетические поражения половых органов	Местное	Отсутствие клинического улучшения	[2]
Рецидивы лабиального герпеса	Местное, в виде видарабинмонофосфата	То же	[118]

Инфекция глаза, вызываемая HSV

В клинических испытаниях эффективности 3%-ной видарабиновой мази и 0,5%-ной идоксуридиновой мази при лечении поверхностных (дендритных или «географических») кератитов [145], которые проводили с соответствующими контролями одновременно в нескольких лечебных центрах, среднее время исцеления было одинаково для обоих препаратов, причем большее число случаев неудачного лечения характерно для группы, леченной идоксуридином (18,8% против 9,5%). Видарабин часто помогал больным, неудачно леченным идоксуридином. Отрицательное действие видарабина при местном применении состояло в раздражении глаза, точечных кератитах, отеке стромы и точечных закупорках сосудов.

При глубоких поражениях глаза, вызываемых HSV, местное применение видарабина или любого другого противовирусного агента не дает эффекта. Однако ограниченные клинические испытания показали, что при внутривенном введении видарабина в больших дозах ($20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ в течение 7 дней) уменьшаются неприятные ощущения, инъецирование сосудов ресничного тела и активность передней камеры; у некоторых больных при этом улучшалась острота зрения и снижался отек роговицы [1].

Энцефалиты, вызываемые HSV

В испытаниях видарабина при лечении подтвержденных биопсией герпетических энцефалитов ($15 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ в течение 10 дней), проведенных в нескольких центрах с контрольными группами, получавшими плацебо, на 30-й день было зарегистрировано уменьшение смертности с 70% в контрольной группе до 28% у реципиентов видарабина (под наблюдением было 28 больных) [219]. Это была первая демонстрация противовирусного действия препарата при герпетическом энцефалите. Последующий опыт лечения видарабином выявил проблемы, которые все еще осложняют постановку диагноза и лечение герпетических энцефалитов [221].

Сейчас смертность при лечении видарабином составляет 33% на 30-ый день и 39% через 6 или 12 мес. Среди выживших после лечения видарабином нескольких объединенных групп больных герпетическим энцефалитом, обследованных через год, было выявлено 54% здоровых, 29% с умеренными расстройствами и 18% лиц, имевших тяжелые нарушения и нуждавшихся в постоянном уходе. При анализе данных по подгруппам было выявлено, что в момент начала лечения видарабином важное прогностическое значение имеют два фактора — возраст и состояние сознания. Так, у 70% больных моложе 30 лет восстановились нормальные неврологические функции, если лечение было начато до наступления комы или полукомы. По контрасту с этим ни у одного больного старше 30 лет, у которого лечение было начато в полукоматозном или коматозном состоянии, нормальные функции не восстановились.

С точки зрения важности раннего начала противовирусной терапии решающим моментом следует считать быстрый, точный диагноз герпетического энцефалита, но эта задача по-прежнему остается очень трудной. Получены данные, согласно которым клинические подозрения на герпетический энцефалит, позволяющие решиться на биопсию мозга, более чем в 40% случаев вирусологически не подтверждаются. У этих больных были выявлены неврологические расстройства, такие как поражения сосудов мозга, абсцессы мозга или другие вирусные неврологические ин-

фекции. Биопсия мозга остается наиболее точным методом постановки диагноза, однако и она может дать ложноотрицательный результат в случае взятия пробы в несоответствующем участке мозга. В одной из групп это наблюдали по крайней мере у 4% больных [221], когда после смерти трех больных с отрицательными результатами биопсии в их мозгу при вскрытии был обнаружен HSV. На ранних сроках болезни с помощью компьютерной томографии иногда не удается обнаружить очаг поражения, и тогда его локализация целиком зависит от выявления местных неврологических симптомов.

В течение ряда лет делались многочисленные попытки разработать точную раннюю диагностику герпетических энцефалитов без биопсии; однако действительно надежного метода нет до сегодняшнего дня. Недавно был предложен интересный метод введения меченого радиоактивного аналога нуклеозидов, который должен накапливаться в клетках, зараженных HSV, в результате активности вирусной тимидинкиназы [161].

Поражение ЦНС и диссеминированная герпетическая инфекция новорожденных

В испытаниях с соответствующими контрольными группами исследовали лечебный эффект видарабина на новорожденных с диссеминированной инфекцией и вызванным HSV поражением центральной нервной системы, — редко встречающимся, но очень тяжелым заболеванием с высокой смертностью и пожизненными осложнениями. Болезнь часто начинается с кожных поражений, за которыми следует системная диссеминация. Видарабин уменьшает смертность при диссеминированном заболевании с 85% до 57%, а при локальном заболевании ЦНС с 50% до 10%; при сравнительном анализе данных, полученных в группах с реципиентами видарабина и реципиентами плацебо, наблюдали статистически достоверную разницу между ними [217]. Однако, несмотря на лечение видарабином, были зарегистрированы тяжелые осложнения, особенно в группе с диссеминированным заболеванием. Так, в этой группе 2 из 14 больных, получавших видарабин, по сравнению с 1 из 13 реципиентов, получавших плацебо, были отнесены к здоровым при наблюдении в течение года. При локальном заболевании ЦНС 5 из 10, получавших видарабин, по сравнению с 1 из 6, получавших плацебо, были отнесены к здоровым после годичного наблюдения. Осложнения у выживших включали микроцефалию, спастические состояния, судороги и слепоту. В этих испытаниях было показано, что ткани часто бывают уже разрушены к моменту первого клинического проявления вирусной инфекции и что самым важным является предотвращение развития болезни и ранняя диагностика.

Лабиальные и генитальные герпетические инфекции

Испытания, проведенные с соответствующими контролями, показали отсутствие эффективности при местном применении видарабина или его монофосфата для лечения герпетических поражений губ [188] или половых органов [2, 76]. В предварительных исследованиях [34] наблюдали улучшение состояния иммуносупрессированных больных, имеющих вызванные HSV поражения кожи и слизистых, при внутривенном лечении видарабином, однако в этих случаях видарабин несомненно уступает ацикловиру.

Ветрянка и опоясывающий лишай у хозяев с угнетенной иммунной системой

В 1982 г. были опубликованы результаты испытания видарабина при заболевании ветрянкой и опоясывающим лишаем людей с угнетенной иммунной системой. Испытания проводили как двойные слепые тесты с контрольными группами, получавшими плацебо. Они многое прояснили в запутанном вопросе об эффективности видарабина при этих заболеваниях, особенно в отношении возможности предотвращения висцеральных осложнений и постгерпетической невралгии. В этих испытаниях все больные поступили в больницу в течение 72 ч от начала ветрянки или опоясывающего лишая, и все они имели сопутствующие скрытые, обычно злокачественные, лимфопролиферативные заболевания, угнетающие иммунитет. Ни один больной не получал иммуноглобулина против возбудителя опоясывающего лишая.

При ветрянке [220] лечение видарабином значительно снижало продолжительность новых высыпаний и частоту висцеральных осложнений. У одного из 19 реципиентов видарабина развилась пневмония, но он выздоровел; у 4 из 15, получавших плацебо, развился гепатит, еще у 4 отмечены гепатит и пневмония. Двое из последней группы умерли.

При опоясывающем лишае [218] лечение видарабином ускорило заживление кожных поражений, измеряемое по прекращению формирования новых поражений или по времени, проходящему до перехода всех поражений в стадию пустул. При учете событий, развивающихся только после поступления больного под наблюдение, видарабин уменьшал частоту случаев кожной диссеминации с 24% до 8%, а висцеральной диссеминации с 19% до 5%. К висцеральным диссеминациям, отмечаемым в процессе наблюдения, относятся увеит, нейропатия, энцефалит и гепатит. Следует отметить, что у больных, не имевших кожной диссеминации в момент поступления (в течение 72 ч от начала раз-

вития опоясывающего лишая), не наблюдалось ни одного случая пневмонии или смерти. Однако из семи больных, уже имевших диссеминированное поражение кожи в момент поступления, двое умерли от пневмонии (один из них получал видарабин, а другой плацебо). Частота постгерпетической невралгии была одинаковой (45%) как у получавших видарабин, так и у реципиентов плацебо. У получавших видарабин продолжительность невралгии сократилась, о чем можно судить по проценту больных, не имевших болей в течение последующих четырех месяцев (56% и 17%, $p=0,047$). При анализе по отдельным подгруппам улучшающий эффект видарабина был более выражен у больных старше 38 лет, а также при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях, так как в этих случаях естественное течение болезни обычно более продолжительное.

К интерпретации представленных выше богатых информацией данных следует подходить с осторожностью. Они, например, не отвечают на вопрос, изменяет ли видарабин исход болезни в случае, если его применяют при опоясывающем лишае уже после происшедшей диссеминации (кожной или висцеральной), — ситуация, при которой часто считают необходимой противовирусную терапию. А вопрос о том, стоит ли применять видарабин при инфекции, вызываемой VZV, остается открытым. Неудобство пролонгированного внутривенного введения этого препарата и его потенциальная подострая и хроническая токсичность при многих ситуациях, встречающихся в клинической практике, перевешивают ожидаемое улучшение. Решение применять видарабин следует принимать на основании индивидуальных данных с учетом всех хозяйских факторов.

Цитомегаловирусные инфекции [35, 120, 150]

Цитомегаловирусные (CMV) инфекции являются трудно разрешимой проблемой у хозяев с угнетенной иммунной системой. Сообщений о широко поставленных с ними испытаниях нет. Однако в нескольких работах показано, что в адекватных дозах видарабин подавляет во время лечения выделение вируса, правда, явного клинического улучшения при этом не наблюдается. Примеры таких исследований включают лечение болезни цитомегалических включений, а также системных заболеваний и ретинитов, вызываемых CMV у лиц с угнетенной иммунной системой.

Другие вирусные инфекции

Результаты, указывающие на отсутствие эффекта видарабина при лечении натуральной оспы (несмотря на активность

препарата в опытах *in vitro*), представляют сейчас чисто исторический интерес [104]. Маркеры хронического гепатита В, такие как ДНК-полимеразная активность частиц Дейна, временно угнетаются видарабином и его монофосфатом [13, 151], а при лечении папавирусной инфекции препарат не приносит явно-го улучшения [155].

Ацикловир

Ацикловир — тривиальное название для 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанина (Зовиракс[®], Burroughs-Wellcome). Это ациклический аналог нуклеозида и прототип нуклеозидных аналогов с избирательным противовирусным действием, основанным на фосфорилировании препарата тимидинкиназой вируса герпеса [61]. В связи с тем что ферменты клетки хозяина не фосфорилируют ацикловир с достаточной эффективностью, ацикловир-монофосфат образуется главным образом в клетках, зараженных вирусом герпеса, в которых присутствует необходимый вирусный фермент [60]. Ацикловирмонофосфат превращается клеточными ферментами в трифосфат (рис. 16.1), который интерферирует с синтезом вирусной ДНК, угнетая вирусную ДНК-полимеразу и действуя как терминатор синтеза ДНК в случае включения в растущую цепь вирусной ДНК. Более того, вирусная ДНК-полимераза угнетается в значительно большей степени, чем клеточная ДНК-полимераза α , что обеспечивает дополнительное усиление специфичности действия препарата [190].

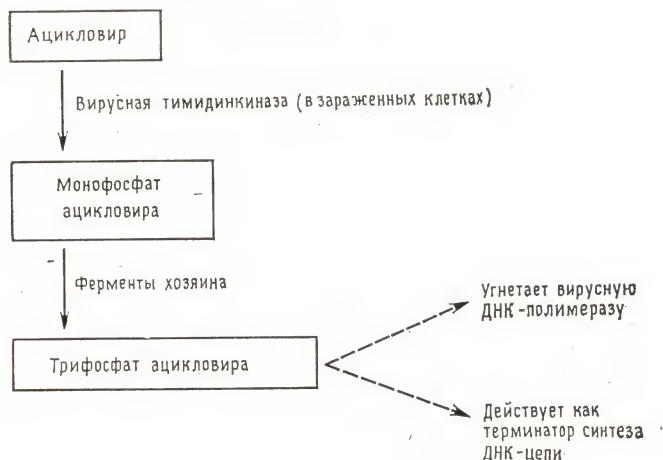


Рис. 16.1. Механизм действия ацикловира.

Противовирусная активность *in vitro*

В культуре ткани ацикловир угнетает HSV [48] и VZV [21], кодирующие свою собственную тимидинкиназу, в значительно более низких концентрациях, чем те, при которых он действует на клетки хозяина (табл. 16.4). Обезьяний герпесвирус В ингибируется аналогичным образом. Цитомегаловирус [204] и вирус Эпштейна — Барр [39, 49], не синтезирующие собственной тимидинкиназы, угнетаются менее эффективно, чем другие герпесвирусы человека, хотя данные опытов *in vitro* позволяют думать,

Таблица 16.4. Ингибирующие дозы ацикловира в культуре ткани

Культивируемый вирус	Концентрация, ингибирующая на 50%, мкМ	Источник данных
Незараженные клетки		
Мононуклеарные клетки крови	100	[115]
Костный мозг	200	[144]
HSV-1	0,15	[48]
HSV-2	1,62	[48]
VZV	3,65	[21]
CMV	>100	[48]
EBV	7	[39]

что при клинически приемлемых концентрациях ацикловира может происходить некоторое угнетение вируса, возможно, с помощью механизма, отличающегося от механизма, известного для HSV. Комбинация интерферона и ацикловира оказывает в культуре фибробластов синергидный угнетающий эффект на HSV, VZV и CMV [114, 191].

Устойчивость к ацикловиру наблюдается у вирусных мутантов с измененными генами тимидинкиназы или ДНК-полимеразы [22, 37, 47, 67, 165]. Устойчивые мутанты могут быть обнаружены в популяциях дикого типа, а мутанты, не имеющие тимидинкиназной активности, легко могут быть индуцированы пассированием HSV в присутствии ацикловира. Такие мутанты наблюдали также у больных, лечившихся ацикловиром [27, 166].

Активность *in vivo* на животных

Местное применение ацикловира эффективно при лечении герпетического кератита у кроликов [93], а также поражений кожи, вызываемых HSV у мышей [68] и морских свинок [40]. Системно применяемый ацикловир эффективен при эксперимен-

тальных энцефалитах, вызываемых HSV у мышей [143], и при заражении кроликов обезьяньим вирусом В [24]. Как видно из исследований на животных, если ацикловир дают систематически до или сразу же после заражения HSV, то он предотвращает развитие латентной инфекции в ганглиях [100]. Однако предсуществующую латентную инфекцию не удастся искоренить даже при длительном курсе ацикловира [101]. У ряда дефектных по тимидинкиназе устойчивых к ацикловиру штаммов HSV снижается вирулентность и появляется способность вызывать латентную инфекцию у мышей, но некоторые устойчивые штаммы сохраняют вирулентность [65, 66, 177]. Еще предстоит установить, какое значение имеют эти результаты для лечения человека.

Токсичность [203]

В соответствии со своим механизмом действия ацикловир относительно не токсичен для клеток в культуре ткани. Небольшое угнетение пролиферации клеток наблюдали при концентрации выше 100 мкМ [115, 136, 144]. Введение крысам ацикловира в дозе 20 мг/кг или более вызывает дисфункцию почек в связи с отложением кристаллов препарата в почечных канальцах. У собак смертельный цитотоксический эффект наблюдали при дозах 100 мг·кг⁻¹·сут⁻¹ и выше.

В двух случаях из 11 был выявлен мутагенный эффект при высокой концентрации ацикловира *in vitro*. При этом наблюдали хромосомные повреждения в культивируемых лимфоцитах и трансформацию клеток BALB/c-3T3. У крыс и мышей не зарегистрировано ни тератогенного, ни канцерогенного эффекта ацикловира.

Клиническая фармакология [25, 110, 111, 187]

Ацикловир одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (FDA) в 1982 г. в виде 5%-ной мази в полиэтиленгликоле для местного применения, а также в виде препарата для внутривенного введения. Пероральные формы исследуют в настоящее время. Для внутривенного применения ацикловир получают в виде хорошо растворимой в воде натриевой соли. Однако при физиологических pH максимальная растворимость ацикловира (неионизованного) в воде составляет 2,5 мг/мл. Его уровень в плазме после внутривенного введения пропорционален дозе. При введении дозы (5 мг/кг или 250 мг/м² каждые 8 ч), которую чаще всего используют при лечении заболевания, вызываемого HSV, стабильные средние максимальные уровни препарата

в плазме составляли 43 мкМ, или 9,7 мкг/мл. Препарат в неизмененном виде в значительной степени выводится с мочой в результате фильтрации в клубочках и секреции [112]. При нормальной функции почек период его полужизни в плазме составляет 2,5 ч, но он увеличивается до 19,5 ч у больных с анурией. При гемодиализе из крови удаляется около 60% ацикловира [113]. После введения препарат распространяется по всему организму. Уровень препарата в спинномозговой жидкости составляет примерно 50% его уровня в плазме. Ацикловир плохо связывается с белком.

Введенный внутривенно ацикловир хорошо переносился больными при клинических испытаниях. Наиболее частыми отрицательными реакциями были местные воспаления и снижение функции почек (у 10% больных в ранних наблюдениях) [94]. Эти осложнения аналогичны дисфункции почек, наблюдаемой у экспериментальных животных при отложении кристаллов ацикловира в почечных канальцах. Если соблюдать правила предосторожности: а) избегать быстрого введения препарата с образованием припухлости; б) адекватно уменьшать дозы при расстройстве функции почек и в) хорошо насыщать организм водой — почечные осложнения могут быть в значительной степени предотвращены. Энцефалопатические изменения наблюдались у 1% больных, получавших ацикловир.

Перорально введенный ацикловир [208] усваивается относительно слабо, и его уровень в крови при таком введении значительно ниже — 3 мкМ при обычной дозе 200 мг. Этой дозы, однако, еще достаточно для угнетения HSV-1 и HSV-2. Поскольку этот путь введения, допускающий применение амбулаторного лечения, очень привлекателен, были проведены специальные клинические испытания. Он хорош также тем, что при характерном для него низком уровне препарата в крови значительно уменьшается вероятность почечных осложнений.

Клинические испытания

Репрезентативные клинические испытания с соответствующими контролями суммированы в табл. 16.5.

Глазная инфекция, вызываемая HSV

В ранних испытаниях, проведенных с соответствующими контролями, 3%-ная мазь ацикловира в сочетании с удалением разрушенных клеток, оказалась эффективной в предотвращении нарастания эпителиального кератита, вызываемого HSV (за 7 дней наблюдения) [90]. Ряд последующих наблюдений показал, что при эпителиальном кератите, вызываемом HSV, мест-

Таблица 16.5. Репрезентативные клинические испытания ацикловира, проведенные с соответствующими контролями

Заболевание	Применение	Результаты лечения	Источник данных
Герпетический кератит	3%-ная мазь, местное	Заживление, сравнимое с наблюдаемым при применении других местных агентов; нет улучшений при поражениях стромы	[41, 45, 90, 108, 146, 226]
Герпетическая инфекция кожи и слизистых у хозяев с иммунодефицитом	1. 5 %-ная мазь, местное	Снижение выделения вируса, быстрое ослабление болей	[216]
	2. Профилактически в/в	Предотвращение реакции инфекции	[162]
	3. Лечение в/в	Снижение выделения вируса, ускоренное заживление, быстрое ослабление болей	[36, 132, 134, 211]
Первичный генитальный герпес	1. 5 %-ная мазь, местное	Снижение выделения вируса, быстрое образование корочки на очагах поражения	[43]
	2. В/в	Снижение выделения вируса, быстрое заживление	[133]
	3. Пероральное	То же	[140]
Рекуррентный генитальный герпес	1. 5 %-ная мазь, местное	Отсутствие клинического улучшения	[43]
	2. Пероральное	Слегка ускоренное заживление	[140]
Рекуррентный лабиальный герпес (нормальный хозяин)	Местное	Отсутствие клинического улучшения	[189]
Ветрянка (хозяин с иммунодефицитом)	В/в	Снижение висцеральных осложнений	[153]
Опоясывающий лишай (нормальный хозяин)	В/в	Уменьшение болей, быстрое заживление в острой фазе; отсутствие эффекта при постгерпетической невралгии	[16, 149]

ное применение ацикловира давало равноценный или даже лучший излечивающий эффект, чем идоксуридина [41, 45], видарабина [146, 226] и трифлюридина [108]. Ацикловирная мазь хорошо переносилась; лишь у небольшого числа реципиентов развива-

лась точечная кератопатия, что наблюдается также у больных, получавших другие глазные противовирусные препараты. Противовирусная терапия глубоких герпетических поражений, таких как заболевания сетчатки или увеиты, остается неудовлетворительной.

Инфекции, вызываемые HSV у больных с дефектами иммунной системы

Поражения HSV кожи и слизистых у больных с дефектами иммунной системы характеризуются длительной репликацией вируса; эти поражения являются важными мишенями для противовирусной терапии.

В проведенных с соответствующими контролями испытаниях, 5 %-ную ацикловирную мазь сравнивали с плацебо при лечении поражений лица или губ, вызываемых HSV у иммунодефицитных хозяев, главным образом реципиентов пересаженных почек [216]. Ацикловир уменьшал среднюю продолжительность выделения вируса с 9,5 дней до 2,5 дней; это высокодостоверная разница. Среднее время заживления поражений (15—16 дней) значительно не различалось у получавших ацикловир или плацебо, однако у больных, леченных ацикловиром, быстрее исчезла болезненность поражений. Для полученных во многих испытаниях ацикловира результатов характерно выраженное и значительное действие препарата на выделение вируса и отсутствие какого-либо действия на состояние больного.

Проведенные в нескольких лечебных центрах и охватывающие 97 больных испытания с соответствующими контрольными группами, получавшими плацебо [132], показали, что внутривенное введение ацикловира иммунодефицитным хозяевам с поражениями кожи и слизистых HSV ведет к значительному сокращению длительности выделения вируса, а также к значительному уменьшению болезненности и зуда в участках поражения и ускорению заживления. Аналогичные результаты были отмечены и в других испытаниях с контролями, проведенных на особые группы больных, подвергшихся пересадке почек, сердца или костного мозга [36, 134, 211]. Было также продемонстрировано, что профилактическое внутривенное введение ацикловира больным с пересаженным костным мозгом предотвращало рецидивы инфекции, вызываемой HSV, которые с высокой частотой наблюдаются у подобных больных [162]. Однако испытания показали, что после прекращения лечения ацикловиром возникает рецидив герпетической инфекции. По-видимому, латентная инфекция в ганглиях, как это было предсказано экспериментами на животных, не подвергается действию препарата. Выделение

штаммов HSV, устойчивых к ацикловиру, во время или после лечения хорошо документировано [27], однако патогенность этих штаммов и клинические характеристики вызываемых ими заболеваний еще не определены.

По предварительным данным у больных с иммунодефицитом пероральное введение ацикловира оказывает такое же действие на вызванное HSV поражение кожи и слизистых, как и внутривенное.

Поражение половых органов

Опубликованы результаты испытаний, проведенных с соответствующими контролями, местного применения 5 %-ного ацикловира при лечении генитальных поражений нормального хозяина, вызываемых HSV [43]. При первичной инфекции, когда выделение вируса и само заболевание обычно тянутся дольше, наблюдалось значительное улучшение, которое проявлялось в прекращении выделения вируса и образовании корки на пораженных участках, но время наступления полного выздоровления не изменялось. При непервичных начальных инфекциях и при рецидивах наблюдалось значительное сокращение времени выделения вируса, но клиническое улучшение было минимальным или вообще отсутствовало. В настоящее время проверяют преимущества начала лечения в продромальном периоде рекуррентной инфекции [139].

При исследовании действия введенного внутривенно ацикловира на тяжесть первичного поражения гениталий HSV отмечено уменьшение продолжительности выделения вируса, формирования новых поражений и симптомов болезни [133]. Средняя продолжительность заживления всех поражений значительно уменьшалась с 14 дней у получавших плацебо до 7 дней у получавших ацикловир. Возможно ли предупреждение рецидивов при раннем противовирусном лечении первичного генитального герпеса? Эта проблема сейчас активно исследуется. Несмотря на разрешение FDA, при первичном генитальном герпесе внутривенное введение ацикловира, по-видимому, нерационально, так как состояние больных, как правило, не бывает настолько тяжелым, чтобы применять такое сложное лечение.

Возможность перорального введения ацикловира была исследована при лечении первичных и рецидивирующих герпетических инфекций половых органов [140]. В этом случае при первичных заболеваниях так же, как при внутривенном введении препарата, продолжительность выделения вируса заметно снижалась, формирование новых поражений и длительность проявления симптомов уменьшались, заживление поражений ускорялось. При реци-

дивах время выделения вируса и время выздоровления статистически достоверно сокращались примерно на один день (под наблюдением было большое число больных). Доля больных, у которых после начала лечения появлялись новые поражения, также снизилась с 19 % до 2 %. Лечение не снимало болезненности в участках поражения. Эти результаты говорят о возможности перорального применения ацикловира при некоторых генитальных герпетических инфекциях, хотя в наиболее часто встречающихся случаях, например при рецидивирующем генитальном герпесе, наблюдаемый эффект незначителен.

Рецидивирующий лабиальный герпес

Проведенные с соответствующими контролями испытания местного применения ацикловира при рецидивирующем поражении губ HSV у нормальных хозяев показали ускорение исчезновения вируса из очагов поражения у лиц, получавших лекарство в течение 8 ч от момента появления поражения, однако клинического улучшения не наблюдалось [189]. Короткое естественное течение этих проявлений затрудняет демонстрацию эффективности любого противовирусного препарата, который не удаляет латентный вирус из ганглиев.

Инфекции, вызываемые VZV

Ветрянка и опоясывающий лишай у иммунодефицитных хозяев могут протекать очень тяжело и представлять потенциальную угрозу жизни. В нескольких центрах проведены клинические испытания внутривенного введения ацикловира таким больным. Исследование небольшой группы больных ветрянкой показало, что у 5 из 11 человек, получавших плацебо, после начала введения развилась пневмония, тогда как у 7 больных, получавших ациклоvir, она отсутствовала; разница находится на пределе достоверности, если учесть количество наблюдавшихся больных [153]. Так как несколько больных, получавших плацебо, были переведены в период испытания на ациклоvir, какой-либо значительной разницы в сроках выздоровления между двумя группами продемонстрировать не удалось. Судя по предварительным результатам, у больных с опоясывающим лишаем под влиянием ацикловира прекращается формирование новых поражений и снижается диссеминация вируса, однако улучшения состояния больных с постгерпетической невралгией продемонстрировать не удалось.

После внутривенного введения ацикловира (5 мг/кг) с соответствующими контролями нормальным хозяевам [149] наблюдалось уменьшение боли в острой фазе опоясывающего

лишая и ускорение заживления поражений. Более значительное улучшение отмечалось среди больных старшего возраста при начале лечения в раннем периоде болезни, а также у больных с температурой. Влияние на постгерпетическую невралгию отсутствовало. В других испытаниях с контролями, в которых использовали более высокую дозу (500 мг/м^2) [16], отмечены возвращение болей у некоторых больных, получавших ацикловир, после прекращения 5-дневного курса лечения, а также высокая частота токсического эффекта в почках (у 11 из 19 больных). Дисфункция почек была обратимой и после отмены препарата исчезала.

Другие применения

В настоящее время в нескольких центрах проводят сравнительное изучение эффективности лечения ацикловиром и видабином вызываемых HSV энцефалитов, подтвержденных биопсией, а также заболеваний новорожденных, вызываемых этим же вирусом.

Данные в отношении эффективности ацикловира при лечении цитомегаловирусных инфекций противоречивы. Отчасти трудности обусловлены неполнотой наших знаний хозяйских факторов, влияющих на исход болезни, а следовательно, факторов, которые необходимо контролировать при проведении испытаний со случайной выборкой. В одном лечебном учреждении результаты таких испытаний были интерпретированы как указывающие на достоверное (на пределе значимости) клиническое улучшение у больных, леченных ацикловиром [11]. Однако 7 из 8 реципиентов трансплантатов костного мозга умерли от подтвержденной биопсией цитомегаловирусной пневмонии, несмотря на лечение ацикловиром в больших дозах — 1200 мг/м^2 с максимальным уровнем в плазме $>200 \text{ мкМ}$ [210].

Лечение ацикловиром инфекции, вызванной вирусом Эпштейна—Барр, было неэффективным в случае двух больных детей с очень тяжелым течением болезни. Один из них с X-связанным лимфопролиферативным синдромом умер [197]. Другого — с EBNA-положительной лимфомой, осложнившей пересадку почки, — лечили несколькими курсами внутривенного введения ацикловира в течение 6 мес [74]. В результате лечения наблюдалось очевидное ослабление органических симптомов с временным уменьшением лимфоаденопатии до последней стадии, когда прогрессирующая болезнь закончилась смертью, несмотря на лечение ацикловиром. Иммунопатологическое исследование выявило эволюцию злокачественных В-клеток от поликлонального к моноклональному составу. Интересно, что

во время лечения этих больных детей ацикловиром выделение вируса Эпштейна—Барр через рот и носоглотку было подавлено, но с прекращением введения препарата оно возобновлялось, в то время как вирурия (выведение вируса с мочой) цитомегаловируса у некоторых больных во время курса лечения сохранялась. Сейчас у студентов проводят контролируемые исследования лечения инфекционного мононуклеоза, вызываемого вирусом Эпштейна—Барр.

Ацикловир дает определенный эффект — временное уменьшение сывороточных вирусных маркеров — при хроническом гепатите В [183] и при местном лечении подошвенных бородавок [14]. Какие-либо механизмы, объясняющие специфический эффект ацикловира при этих заболеваниях, неизвестны.

Другие аналоги нуклеозидов

Помимо видарабина и ацикловира в качестве потенциальных препаратов для противовирусной терапии были исследованы многие нуклеозидные аналоги, но в настоящее время ни один из них не получил широкого распространения. Лишь два одобренных FDA препарата этой категории — идоксуридин и трифлюридин (трифтортимидин) — используются для местного лечения эпителиальных герпетических кератитов. Однако некоторые из новых агентов этой категории аналогично ацикловиру специфически активируются вирусной тимидинкиназой. Наилучшими были бы препараты, избирательно действующие на вирусы с широким спектром действия в отношении разных вирусов и с улучшенными фармакокинетическими свойствами, такими как эффективность усвоения в желудочно-кишечном тракте. Некоторые из препаратов находятся в ранней стадии клинических испытаний. В настоящее время исследуются препараты бормвинилдезоксидеоксиридин (БВДУ), фториодарацитозин (ФИАЦ) [118], а также различные производные видарабина и ацикловира [185]. Другим аналогом нуклеозидов, для которого накоплен некоторый клинический опыт, является рибавирин.

Идоксуридин

Идоксуридин был первым противовирусным препаратом, оказавшимся эффективным при местном лечении эпителиального герпетического кератита [92]. Его используют для этой цели и сейчас, хотя часть больных обычно к нему нечувствительна. Постепенно выявляются штаммы HSV, устойчивые к идоксуридину, многие из них чувствительны к другим нуклеозидным аналогам, таким как видарабин, трифлюридин или

ацикловир. Изучалось также местное применение идоксуридина для лечения кожных герпетических инфекций. Под действием идоксуридина и ДМСО наблюдается некоторое улучшение состояния больного при местных симптомах опоясывающего лишая [119, 223]; эти препараты подавляют также образование вирусных частиц, но не дают клинического улучшения при генитальном герпесе [179]. Следует отметить, однако, что местное применение идоксуридина иногда вызывает неблагоприятные местные реакции, например сенсibilизацию [5]. Сначала идея системного применения идоксуридина при таких состояниях, как герпетический энцефалит, была воспринята с энтузиазмом, однако впоследствии проведенные с соответствующими контролями клинические испытания показали не только отсутствие улучшения, но и высокую токсичность препарата [23].

Цитарабин

Цитарабин (цитозинарабинозид) испытывали в качестве противовирусного препарата для системного применения, так как он обладал хорошей ингибирующей активностью *in vitro* против герпесвирусов. Но после проведения клинических испытаний на больных с диссеминированным опоясывающим лишаем и с герпетическими энцефалитами выявилась токсичность этого препарата для хозяина и было показано отсутствие у него специфичности в отношении вирусов [163, 192].

Трифлюридин

Трифлюридин (трифтортимидин) является одним из лучших среди доступных сейчас препаратов для местного лечения герпетических кератитов, что показано в ряде проведенных с соответствующими контролями испытаний [29]. Препарат обладает некоторой активностью *in vitro* против цитомегаловируса [224]; для системного применения в клинике он еще не достаточно хорошо охарактеризован.

Бромвинилдезоксисуридин

Бромвинилдезоксисуридин (БВДУ) [4, 55, 56] — высокоактивный препарат против VZV. Он также высокоактивен против HSV-1 и менее активен против HSV-2; его избирательная активность была использована для идентификации вируса в клинических изолятах HSV. Препарат хорошо усваивается при пероральном введении и может оказаться полезным для амбулаторного лечения болезней, вызываемых VZV, если будут

успешными его клинические испытания. Показана его терапевтическая эффективность на животных [51, 53, 121, 122] и получены предварительные обнадеживающие результаты в клинике, например при лечении герпетических кератитов и заболеваний, вызываемых VZV у больных с угнетением иммунной системы [54].

Рибавирин

Испытания рибавирина (Виразол[®], ICI) ведут уже несколько лет, однако его клинические возможности все еще не ясны. Он отличается от других аналогов тем, что не относится ни к пуринам, ни к пиримидинам, а состоит из триазольного компонента, присоединенного к рибозе. Он фосфорилируется в клетках и ингибирует инозинмонофосфат — дегидрогеназу, которая участвует в синтезе гуанозинтрифосфата [196]. Отмечено также снижение под действием рибавирина внутриклеточного содержания тимидинтрифосфата. Препарат обладает широким спектром противовирусной активности *in vitro* [178]; опубликованы данные испытаний на животных (например, с вирусом Ласса [178]) и клинических исследований (например, при гепатите В [88], кори [206], генитальном герпесе [17]). Однако следует отметить, что в основном клинические испытания фокусировались на его применении при гриппе В. В нескольких испытаниях с двойным слепым контролем не удалось выявить эффективности препарата при его систематическом введении для профилактики или лечения гриппа, так как полученные результаты были противоречивы [182]. Некоторые исследования позволяют думать об улучшении состояния больных при использовании рибавирина, другие свидетельствуют об отсутствии положительного эффекта. Рибавирин обладает системной токсичностью, нарушает многие функции организма, в том числе функции печени, и вызывает анемию. Проведенные недавно во время вспышки гриппа А исследования эффективности вдыхания аэрозоля рибавирина показали у леченых больных значительное уменьшение температуры, системных симптомов и выделения вируса [103].

Интерфероны (см. гл. 15)

Клетки позвоночных в ответ на различные индуцирующие стимулы синтезируют белки — интерфероны, создающие в клетках хозяина антивирусное состояние с помощью механизма, для которого необходим продолжающийся синтез клеточной РНК и белков. С момента описания этого феномена в конце 50-х гг. многое стало известно о природе индуцирующих сти-

мулов, молекулярных характеристиках интерферонов и механизмах, лежащих в основе обусловленного ими антивирусного состояния. Кроме того, было обнаружено, что помимо противовирусного действия интерфероны обладают чрезвычайно разнообразными биологическими активностями. Недавние успехи в получении чистых препаратов интерферона в больших количествах стимулировали широкий интерес к клиническим испытаниям экзогенного интерферона для лечения вирусных, предположительно вирусных и неопластических заболеваний. Не ослабевает также интерес к клиническому применению синтетических индукторов интерферона.

Номенклатура и характеристика [193]

На основании иммунной реактивности, лабильности в кислой среде, образующих их клеток, спектра хозяев и недавно определенной гомологии аминокислотных последовательностей (табл. 16.6) интерфероны разделены на три класса: α , β и γ .

Таблица 16.6. Классификация интерферонов

Тип	Типичные продуцирующие клетки	Кислотоустойчивость	Молекулярная масса	Аминокислотная гомология
α	Лейкоциты	¹	15 000 — 21 000 (два компонента)	40 % гомологии между α - и β -интерферонами
β	Фибробласты	+	20 000	
γ	Т-лимфоциты		44 000	

¹ α -Интерферон обычно кислотоустойчив, но существует и кислотолабильная форма.

α -Интерферон представлен более чем 22 подклассами, очень сходными по аминокислотным последовательностям, и соответствует тому, что ранее называли «лейкоцитарным» интерфероном, так как интерферон, индуцированный в лейкоцитах периферической крови, состоит в основном из смеси α -подклассов. β -Интерфероны, ранее называвшиеся фибробластными по клеткам-продуцентам, имеют 40 %-ную аминокислотную гомологию с α -интерферонами, мол. массу $\sim 20\,000$ и обычно гликозилированы. Интерфероны α и β раньше объединяли в группу классических или интерферонов типа I. γ -Интерферон, прежде известный как «иммунный» интерферон или интерферон типа II, отличается от α - и β -интерферонов по лабильности в кислой среде и аминокислотной последовательности. Обычно γ -интерферон продуцируется Т-лимфоцитами в ответ на митогены или антигены, к которым эти лимфоциты sensi-

билизированы. Получены специфические антисыворотки, нейтрализующие интерфероны только того класса (α , β или γ), против которого они приготовлены. Первоначально предполагали, что и интерферон проявляет активность только в отношении тех видов животных, в организме которых он был индуцирован, но обнаружилось, что это не совсем верно: например, человеческий α -интерферон активен в отношении нескольких видов млекопитающих, тогда как человеческие β - и γ -интерфероны имеют более узкий спектр хозяев. Обычно измеряют активность интерферона по его защитному противовирусному эффекту в культуре ткани; такие анализы трудоемки, и результаты их значительно варьируют от одного определения к другому. С появлением гомогенных препаратов интерферона был разработан иммунологический метод его количественного определения.

Биологическая активность интерферона [193]

Индукция

Продукция интерферона в клетках хозяина может индуцироваться вирусом или (при определенных экспериментальных условиях) двухцепочечной РНК, синтетическими полирибонуклеотидами, высокомолекулярными и низкомолекулярными веществами (к последним относится, например, тилорон). Некоторые из этих веществ исследованы с целью выяснения, возможно ли их использование в клинике. Молекулярные механизмы индукции интерферонов остаются неясными. Интерферон участвует в регуляции своего собственного синтеза с помощью процессов, известных как праймирование (увеличение индукции интерферона после воздействия им в низких концентрациях) и блокирование (отсутствие индукции интерферона после воздействия им в высоких концентрациях). Кроме того, изменения в условиях индукции могут привести к *гипореактивности* и *супериндукции*.

Противовирусная активность

До недавнего времени сведения о механизме противовирусного действия интерферона были скудны. Было известно лишь то, что интерферон связывается с клеточной поверхностью, что противовирусная активность зависит от синтеза РНК и белка в клетках реципиента и что благодаря этой зависимости подавляются вирусная транскрипция и (или) трансляция. Недавно были обнаружены новые белки, синтезируемые в ответ на

Таблица 16.7. Зависимые от двухцепочечной РНК ферментативные активности, индуцируемые интерфероном

Фермент	Действие
Протеинкиназа 2',5'-Олигоаденилат — синтетаза	Фосфорилирует eIF-2; угнетает инициацию синтеза полипептидной цепи Активирует эндорибонуклеазу; деградирует мРНК

интерферон (табл. 16.7). При изучении механизмов, участвующих в выраженном подавлении белкового синтеза, в экстракте обработанных интерфероном клеток под действием двухцепочечной РНК (дцРНК) были обнаружены ферментативные активности, которые проявлялись только в присутствии дцРНК и АТР [10, 227]. Одним из ферментов оказалась 2',5'-олигоаденилат—синтетаза, синтезирующая 2',5'-олигоаденилаты [96], а другим — протеинкиназа, фосфорилирующая некоторые белки, в том числе фактор инициации eIF-2 (необходимый для инициации синтеза пептидов). Обнаружено также, что 2',5'-олигоаденилаты активируют эндонуклеазу, которая может вызывать деградацию вирусной или клеточной мРНК. Фосфодиэстеразная активность, также обнаруженная в обработанных интерфероном клетках, по-видимому, регулирует этот процесс, вызывая деградацию 2',5'-олигоаденилата. Сообщалось также, что в клеточных экстрактах, обработанных интерфероном, последний нарушает метилирование или экпирование нуклеотидов на 5'-конце мРНК [174], и это может влиять на способность мРНК связываться с рибосомами. Хотя эти последние наблюдения позволяют представить механизмы, с помощью которых может подавляться синтез белка, например путем деградации мРНК или на уровне трансляции, специфичность противовирусного действия интерферона до настоящего времени объяснить не удалось.

Влияние на клетки хозяина

С первых дней изучения интерферона было известно, что в обработанных интерфероном клетках хозяина происходят различные изменения, не связанные с резистентностью к вирусу (табл. 16.8). Сначала сомневались, действительно ли эти изменения обусловлены интерфероном или какими-либо компонентами, присутствующими в препаратах интерферона. Однако теперь, когда эти эффекты продемонстрированы в опытах с практически чистыми препаратами интерферона, сомнений больше не осталось [9].

Таблица 16.8. Некоторые эффекты интерферонов, отличные от противовирусного

Угнетение роста клеток
Модулирование иммунитета
Изменение клеточной поверхности
Действие на дифференцировку клеток
Изменение клеточного метаболизма

Одним из наиболее важных эффектов интерферона является угнетение клеточной пролиферации. Интерферон задерживает развитие различных фаз клеточного цикла и переход клеток от фазы покоя к фазе синтеза ДНК и репликации [46]. Антипролиферативный эффект наблюдали *in vitro* в опытах на животных и при неопластических образованиях человека. Именно им объясняют подавление функций костного мозга под действием интерферона, и именно на нем основаны надежды на лечение рака интерфероном.

Интерферон модулирует несколько звеньев гуморального и клеточного иммунитета [194]. Под его влиянием может уменьшаться или увеличиваться в зависимости от условий эксперимента синтез антител, повышаться активность естественных киллеров, цитотоксичность Т-клеток и макрофагальный фагоцитоз, снижаться гиперчувствительность замедленного типа, отторжение трансплантатов и реакция «трансплантат против хозяина». Эти и другие эмпирические факты, а также влияние интерферона на клеточные поверхности, на дифференцировку и подвижность клеток пока недостаточно изучены на молекулярном уровне.

Производство интерферона для клинического применения

Разработано несколько методов получения интерферона в количествах, достаточных для клинического использования. В настоящее время известно несколько видов интерферона, получаемых из разных источников.

Лейкоцитарный интерферон

В соответствии с методом, впервые примененным в финской службе переливания крови, лейкоцитарный интерферон производят в больших количествах с помощью человеческих лейкоцитов, которые праймируют интерфероном и индуцируют инактивированным нагреванием вирусом Сендай [28]. Интерферон частично очищают осаждением тиоцианатом калия с после-

дующим растворением и избирательным осаждением из холодного раствора этанола. Получен препарат, содержащий около 1 % α -интерферона с выходом примерно от 1 до 4 млн. ед. на единицу крови. До недавнего времени это был основной источник интерферона для клиники.

Лимфобластный интерферон [77]

Клеточная линия лимфобластов Namalva (содержащая геном вируса Эпштейна—Барр) может расти в суспензионной культуре до высокой плотности. В этих клетках интерферон индуцируется парамиксовирусом, и в результате стандартной очистки его получают в значительно более чистом виде, чем лейкоцитарный интерферон. Обычно препарат содержит около 85 % α -интерферона и 15 % β -интерферона. Разработка методов получения интерферона в больших количествах позволила провести его клинические испытания [152].

Рекомбинантный интерферон

После успешного клонирования генов интерферона и их экспрессии в бактериях [138, 200] несколько компаний начали производство препарата в коммерческих масштабах. α -2-Интерферон проверяется в клинике с 1981 г., и с увеличением доступности этого препарата быстро накапливается связанный с ним клинический опыт. Рекомбинантные препараты состоят из молекул только одного вида, и их клинический эффект может отличаться от эффекта интерферона, получаемого из природных источников.

Фибробластный интерферон

Фибробластный интерферон образуется фибробластами в культуре клеток после предварительного праймирования интерфероном и индукции $\text{poly(I)} \cdot \text{poly(C)}$ при обработке культуры ингибиторами синтеза РНК или белка (супериндукция) [19]. С полученным препаратом проводили ограниченные клинические испытания. По фармакокинетическим свойствам он отличается от α -интерферона.

Противовирусная активность in vitro

Спектр противовирусной активности интерферона очень широк, причем для некоторых вирусов характерна повышенная чувствительность к угнетающему действию интерферона in vitro [193]. Исследования показали, что, например, вирус вези-

кулярного стоматита чрезвычайно чувствителен к интерферону, в то время как чувствительность герпесвирусов значительно меньше. Поскольку на размножение вирусов в культуре влияют многочисленные факторы, такие как множественность заражения, наличие или отсутствие ассоциации вируса с клетками, уровень подавления в различных системах определения сильно варьирует. Например, эффект интерферона менее выражен в отношении клеток, зараженных CMV [84] и VZV [156], чем в отношении внеклеточного вируса, а с увеличением множественности заражения количество интерферона, требующееся для угнетения вируса, возрастает.

Противовирусная активность *in vivo* [193]

В профилактических и терапевтических исследованиях с экзогенными интерферонами *in vivo* используют большое разнообразие животных, индуцирующих вирусов, схем введения и доз интерферона. Опыт, накопленный на сегодняшний день, показывает, что профилактика или раннее лечение интерфероном намного эффективнее лечения, которое начинают проводить после появления симптомов заболевания. Во многих случаях противовирусный эффект улучшается также при увеличении доз интерферона. Показано, что местное применение интерферона эффективно при поражении глаз и кожи кролика вирусом осповакцины, а также при герпетическом кератите обезьян. Системное применение интерферона защищает мышей от внутримозгового заражения VSV; отмечено также снижение смертности мышей, леченных интерфероном в течение четырех дней после интраназального заражения их тем же вирусом. Интерферон защищает обезьян против заражения вирусом осповакцины и HSV и обладает некоторой эффективностью против вируса бешенства при введении после заражения [83].

Клиническая фармакология [18, 126]

При клинических испытаниях препараты интерферона вводили местно, внутримышечно, подкожно, внутривенно и в спинномозговой канал. До недавнего времени фармакокинетические исследования интерферона осложнялись вариабельностью состава и биологической активности различных его препаратов, а также неизбежной вариабельностью при биологических определениях активности интерферона. Успехи, достигнутые в получении рекомбинантных препаратов, и развитие иммунных методов их определения облегчили работу в этой области; обнаружено, что рекомбинантный α -2-интерферон и лейкоци-

тарный интерферон имеют сходную фармакокинетику [72].

При внутривенном введении интерферон быстро выводится из кровотока (с периодом полужизни ~ 10 мин), после чего в крови сохраняется остаточная фракция. Первоначальное быстрое исчезновение, возможно, обусловлено связыванием интерферона с тканями. При длительном введении интерферон сохраняется в кровеносной системе с периодом полужизни от 2 до 4 ч. У некоторых больных внутривенное введение лейкоцитарного интерферона вызывает тяжелые системные реакции [195].

После внутримышечного или подкожного введения уровень лейкоцитарного интерферона достигает максимума через несколько часов и еще определяется в крови через 24 ч. Таким образом, допустимо введение интерферона один или два раза в сутки. При внутримышечном введении рекомбинантного интерферона в дозе $18 \cdot 10^6$ ед. достигается уровень ~ 150 ед./мл. Фибробластный интерферон при внутримышечном введении не достигает удовлетворительного уровня [20, 125].

Интерферон плохо проникает в межклеточное пространство и в спинномозговую жидкость и плохо усваивается при пероральном введении. При интраназальном введении он быстро выводится, но путем повторных введений в больших количествах можно поддерживать необходимый уровень. Метаболическая судьба интерферона изучена недостаточно. С мочой он выводится незначительно, а относительно его распада в печени или экскреции с желчью данных нет. Интерферон влияет на обмен других препаратов, возможно, путем воздействия на систему цитохрома Р-450. Не исключено, что это связано с цитотоксичностью одновременно вводимых препаратов; так, например, видарабин при введении совместно с интерфероном проявляет большую нейротоксичность [160].

Применяемый для лечения интерферон вызывает ряд побочных явлений, главным образом лихорадку, утомление, анорексию, потерю веса, тошноту и рвоту, угнетение костного мозга, боль в месте инъекции, лимфоаденопатию и небольшую потерю волос [170]. Лихорадка, как правило, исчезает через несколько дней, несмотря на продолжающееся лечение интерфероном; конституционные симптомы сохраняются и время от времени становятся факторами, требующими ограничения дозы. Угнетение костного мозга зависит от дозы и проявляется в снижении содержания гранулоцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов и иногда лимфоцитов. В некоторых случаях может потребоваться ограничение дозы. После отмены препарата гранулоциты и тромбоциты, количество которых снизилось под влиянием интерферона, имеют тенденцию к быстрому восстановлению (1—2 дня). У некоторых больных наблюдался повы-

шенный уровень сывороточной трансаминазы. Идентичность побочных эффектов, наблюдаемых при использовании лейкоцитарного интерферона и рекомбинантного препарата со степенью чистоты выше 95 %, свидетельствует о том, что побочные эффекты вызываются непосредственно интерфероном, а не загрязняющими примесями [72, 85, 176]. Имеются данные об образовании противоинтерфероновых антител к фибробластному интерферону [207].

Клинический опыт использования экзогенного интерферона в качестве противовирусного агента (58, 59)

Результаты испытаний с соответствующими контролями суммированы в табл. 16.9.

Таблица 16.9. Проведенные с соответствующими контролями репрезентативные клинические испытания интерферонов как противовирусных агентов

Заболевание	Применение	Результаты лечения	Источник данных
Профилактика риновирусных заболеваний (насморк)	Местное	Уменьшение частоты заболеваний и выделения вируса после заражения	[127, 169]
Герпетические кератиты	Местное	Ускорение заживления при сочетании с удалением обломков клеток	[89, 198]
Опоясывающий лишай у иммунодефицитных хозяев	В/м	Ускорение заживления кожных поражений; меньшая кожная и висцеральная диссеминация, уменьшение частоты постгерпетических невралгий	[129]
Ветрянка у иммунодефицитных хозяев	»	Уменьшение формирования пузырьков	[8]
Лабиальный герпес, профилактика после хирургической операции на тройничном нерве	»	Уменьшение реактивации лабиального герпеса	[147]
Герпесвирусные инфекции, профилактика после трансплантации почек	»	Отсутствие статистически достоверного клинического эффекта, уменьшение реактивации CMV; отсутствие статистически достоверного действия на HSV и EBV	[31, 32]

Кератиты, вызываемые HSV

Для выявления профилактического или лечебного действия интерферона при герпетических дендритных кератитах необходима местная обработка высокоактивными препаратами интерферона вместе с некоторыми формами дополнительной терапии. Например, в ходе местного лечения препаратами лейкоцитарного интерферона в дозе $33 \cdot 10^6$ ед./мл или $11 \cdot 10^6$ ед./мл при минимальном удалении разрушенных клеток процент рецидивов составлял 20 и 30 % соответственно при 49 % рецидивов в группе лиц, получавших плацебо. Это статистически достоверная разница между группами лиц, получавших высокую дозу интерферона и плацебо [89]. Аналогично при совместном применении лейкоцитарного интерферона ($3 \cdot 10^6$ ед./мл) и термокаутеризации время заживления меньше чем при одной термокаутеризации [198]. Показано также, что в этих условиях эффективен фибробластный интерферон, причем эффективность его комбинации с трифлюридином выше, чем эффективность трифлюридина [56].

Эпидемические кератоконъюнктивиты

При местном применении препаратов человеческого фибробластного интерферона в испытаниях с соответствующими контролями уменьшались продолжительность заболевания и количество осложнений у больных аденовирусными кератоконъюнктивитами [158]. Согласно результатам других предварительных испытаний, проведенных с соответствующими контролями, лейкоцитарный интерферон не давал такого эффекта [190].

Респираторные вирусные инфекции

В связи с быстрым удалением интерферона при местном интраназальном применении для получения требуемого эффекта необходимо частое введение больших доз интерферона или другие методы поддержания достаточной местной концентрации интерферона. В ранних экспериментах [127] было показано, что при частом интраназальном распылении интерферона в течение четырех дней после заражения риновирусом при тотальной дозе лейкоцитарного интерферона $1,4 \cdot 10^7$ ед. тяжесть заболевания и выделение вируса уменьшались, если заражение проводили на второй день после начала введения интерферона. В более поздних экспериментах с очищенным [169] и рекомбинантным интерфероном [168] этот эффект подтвердился. Терапевтическая эффективность интерферона до сих пор не продемонстрирована.

Инфекции, вызываемые VZV

В испытаниях с соответствующими контрольными группами показано, что в случае опоясывающего лишая у иммуносупрессированного хозяина раннее 1-недельное системное введение лейкоцитарного интерферона ($5 \cdot 10^5$ ед. \cdot кг $^{-1}$ \cdot сут $^{-1}$) ускоряет заживление кожных поражений, уменьшает кожную и органную диссеминацию, а также степень постгерпетической невралгии [129]. Сокращенный 2-дневный курс лечения не влияет на течение болезни при первичной дерматоме, но уменьшает кожную диссеминацию и постгерпетическую невралгию [128]. В нескольких центрах были проведены испытания с контролями лейкоцитарного интерферона при ветрянке у детей, страдающих раком. В них было показано, что при ранней терапии время формирования новых пузырьков уменьшается [8]. Угрожающая жизни диссеминация (пневмония, энцефалиты, кровоточивость, тяжелые гепатиты) наблюдалась у 3 из 18 реципиентов плацебо и полностью отсутствовала у 21 реципиента интерферона ($p=0,11$).

Профилактика герпесвирусных инфекций

В испытаниях с контролями исследовали полезность системного применения интерферона для профилактики инфекций, вызываемых HSV, CMV и EBV в некоторых группах высокого риска. Среди больных, подвергавшихся операциям корня тройничного нерва, имевших в анамнезе герпетические поражения губ, после операции наблюдали большое число случаев реактивации HSV. В этой ситуации профилактическое внутримышечное введение лейкоцитарного интерферона ($7 \cdot 10^4$ ед. \times \times кг $^{-1}$ сут $^{-1}$ в течение 5 дней, начиная с дня, предшествующего операции) уменьшало частоту вирусологической и (или) клинической реактивации [147]. Разница между группами, получавшими плацебо и интерферон, основывающаяся только на клинической реактивации, была статистически недостоверна. Никакого влияния на частоту последующих случаев реактивации не наблюдалось. В проведенных с соответствующими контролями испытаниях профилактического внутримышечного 6-недельного введения лейкоцитарного интерферона больным с трансплантацией почки [31, 32] частота реактивации HSV и EBV значительно не изменялась, однако у реципиентов плацебо выделение CMV начиналось раньше и вiremия наблюдалась чаще. Введение антитимоцитарного глобулина противодействовало положительному эффекту интерферона. В другом исследовании, проведенном на той же популяции больных, показано отсутствие улучшения при внутримышечном введе-

нии фибробластного интерферона, причем интерферон в сыворотке в этом случае не определялся [213].

Инфекции, вызываемые вирусом гепатита В

В кратковременных клинических испытаниях, проведенных с контрольными группами [215] или без них [71], лейкоцитарный интерферон временно уменьшал репликацию вируса гепатита В, измеряемую по ДНК-полимеразной активности сывороточных частиц Дейна. В клинических испытаниях [171—173], проведенных без соответствующих контрольных групп, иногда, особенно у женщин, наблюдалось долговременное угнетение активности вируса гепатита В, связанное с действием интерферона, причем такой результат чаще наблюдали при комбинации интерферона с видарабином. В связи с тем что комбинированное применение этих препаратов потенциально более токсично, чем применение любого из них по отдельности, в испытаниях с соответствующими контролями изучается эффективность и безопасность терапевтического режима ежемесячного чередования интерферона и видарабинмонофосфата [184].

Цитомегаловирусная инфекция

При системном применении лейкоцитарного интерферона у младенцев с врожденной инфекцией CMV временно угнетается вирурия (выведение вируса с мочой) [6, 62]. У реципиентов костного мозга, больных CMV-пневмонией с тяжелым угнетением иммунной системы, лейкоцитарный интерферон — один или в комбинации с видарабином [130] — не предотвращал смертности и не устранял вирус из легких.

Врожденная краснуха

У трех младенцев с синдромом врожденной краснухи лечение лейкоцитарным интерфероном привело к временному снижению выделения вируса из глотки, но при этом в глотке и в моче он по-прежнему присутствовал [7]. При лечении интерфероном краснухи описаны единичные случаи прекращения виремии, но без устранения вирурии [109].

Другие вирусные инфекции

Известен единичный случай выздоровления леченного интерфероном и гипериммунным глобулином больного, заразившегося в лаборатории вирусом Эбола, правда, роль интерферона в выздоровлении неизвестна [63]. Имеется одно сообщение

о том, что интерферон не изменил течения болезни Крейцфельда—Якоба [105]. В ряде публикаций сообщается о смерти больных с симптомами бешенства, несмотря на лечение их интерфероном, который вводили в спинномозговой канал [30]. Двое детей с острым лимфоидным лейкозом, находившиеся в состоянии ремиссии, умерли от коревой энцефалопатии, не реагируя на интерферон [141]. Лечение фибробластным интерфероном не вызвало улучшения у больного подострым склерозирующим панэнцефалитом [12]. В результате системного и местного лечения интерфероном, по-видимому, улучшается состояние при ювенильном ларингиальном папилломатозе [73]. Давало эффект введение лейкоцитарного интерферона в бороздки у человека [148].

Индукторы интерферона

Интерес к индукторам интерферона в значительной мере сосредоточен на синтетическом полирибонуклеотиде poly (I) · poly (C). Большинство работ с ним было сделано в те времена, когда препараты экзогенного интерферона были по существу недоступны для клинического использования. В ряде клинических испытаний не удалось продемонстрировать значительного эффекта poly (I) · poly (C) при лечении вирусных инфекций [64, 69]. Хотя неблагоприятные реакции, такие как лихорадка, тошнота, рвота, были относительно умеренными и легко переносились больными [44], результатом введения poly (I) · poly (C) было развитие гипореактивности, из-за которой при последующем введении индуктора синтезировалось меньше интерферона. Однако эффект гипореактивности снижается при введении комплекса poly (I) · poly (C) с полилизиним и карбоксиметилцеллюлозой [poly (ICLC)]. Этот комплекс активно индуцирует интерферон, и недавно начаты его клинические испытания [116]. Некоторые низкомолекулярные индукторы интерферона привлекают к себе внимание в связи с тем, что они активны в опытах на животных, однако их эффективность в индукции интерферона у человека показать не удалось. Один из таких агентов, тилорон, вызвал ретинопатию.

Амантадин и римантадин

Амантадин был лицензирован в США в 1966 г. для профилактики «азиатского» гриппа (H2N2); впоследствии показания к применению были расширены и включили в себя профилактику и раннее лечение всех инфекций, вызываемых вирусом гриппа А. Кроме того, имеются клинические данные об использовании его для лечения болезни Паркинсона. Римантадин

в настоящее время проходит испытания. Химически амантадин представляет собой 1-адамantanамин, а римантадин является α -метилпроизводным амантадина.

Противовирусная активность *in vitro* [50, 205]

В культуре ткани амантадин угнетает размножение всех испытанных до настоящего времени подтипов вируса гриппа А, правда, чувствительность штаммов к нему варьирует. При пассивировании вирусов в присутствии препарата развивается устойчивость к нему. Амантадин обладает также активностью *in vitro* против вируса гриппа С, вируса Сендай, вируса псевдобешенства, вируса денге и вируса краснухи. Большинство других вирусов устойчивы к препарату. К ним относятся вирус гриппа В, вирусы парагриппа типа 1—3 и респираторно-синциальный вирус. Римантадин имеет такой же противовирусный спектр, как амантадин.

Показано, что амантадин действует на ранних стадиях вирусной инфекции [180]. Электронно-микроскопические исследования свидетельствуют о том, что препарат предотвращает раздевание вируса после его проникновения в клетки. Возможно также, что он действует на инициацию транскрипции РНК.

Противовирусная активность *in vivo*

Если мышам перед их заражением вирусом гриппа А ввести амантадин, то эффективность заражения, процент пневмоний и смертность значительно снижаются [50]. Есть сообщение о том, что римантадин эффективнее, чем амантадин, предотвращал размножение вируса, измеряемое по передаче инфекции путем контактов с зараженными животными [167]. Если амантадин вводили мышам через 48 ч после заражения, то наблюдали некоторое увеличение выживаемости [123]. Амантадин не обладал активностью против вируса краснухи у макаков-резусов, хомячков и кроликов.

Токсичность

Амантадин слаботоксичен для животных, но он снижает плодовитость и является тератогенным для крыс; следовательно, его применение во время беременности нельзя считать безопасным.

Клиническая фармакология [142]

Амантадин поставляется в виде гидрохлорида и хорошо усваивается при пероральном приеме. Для профилактики виру-

са гриппа А амантадин используют обычно в дозе 100 мг два раза в день. Концентрация амантадина в сыворотке и в носовом секрете достигает максимума через 4 ч после введения препарата в дозе 2,5 мг/кг и составляет 0,3 мкг/мл и 0,02—0,8 мкг/мл соответственно. Эти концентрации ниже концентраций, необходимых для подавления размножения многих штаммов вируса гриппа А *in vitro* на 50 %. Около 90 % введенной дозы выводится в неизмененном виде с мочой.

При проведении испытаний с вирусом гриппа у лиц, получавших амантадин, в 1—10 % случаев развивались симптомы со стороны ЦНС, такие как сонливость, затруднения в концентрации внимания, головокружение и беспокойство [26]. В большинстве случаев частота таких симптомов значительно не отличалась в группах, получавших плацебо, и группах, получавших амантадин. При введении более высоких доз амантадина, таких как при лечении болезни Паркинсона, токсичность в отношении ЦНС проявляется чаще, причем к перечисленным выше симптомам добавляются ретикулярит и отек лодыжек. При лечении римантадином неблагоприятные побочные реакции встречаются реже [80].

Клиническое изучение

Профилактика вируса гриппа А

В условиях двойного слепого теста с применением плацебо было показано, что под влиянием амантадина эффективность заражения вирусом гриппа А (штаммы H2N2 и H3N2) уменьшается примерно на 50 %; измерения проводили по сероконверсиям или по появлению симптомов [186, 201]. Аналогичные данные были получены для римантадина. Во время эпидемических вспышек вируса гриппа А в полевых испытаниях, проведенных с соответствующими контролями, было показано, что у лиц, получавших амантадин, заболеваемость уменьшается на 50—90 % [57, 135, 154]. Однако в предотвращении гриппа В амантадин не эффективен.

Лечение гриппа А

Когда амантадин начинали давать больным в период 24—48 ч от момента появления симптомов гриппа А, продолжительность и уровень повышенной температуры уменьшались, причем это уменьшение было статистически достоверно [70, 79, 102, 202, 225]. Вместе с тем показать влияние амантадина на гриппозную пневмонию не удалось. Для достижения более вы-

сокой концентрации препарата использовали интраназальное применение аэрозолей амантадина и римантадина [78]. При этом наблюдали некоторое местное раздражение от аэрозоля, но симптомы болезни исчезали быстрее.

Показания для клинического применения

Амантадин не нашел широкого применения при лечении гриппа А. Это связано с трудностями идентификации возбудителя вспышки, неблагоприятным воздействием препарата на ЦНС и органы размножения хозяина, а также неполнотой защиты при его введении [159]. Обычно амантадин рекомендуют использовать для а) лиц, контактирующих с больными дома, б) персонала и пациентов больниц при появлении там больного гриппом А, в) лиц, находящихся в домах престарелых и других подобных учреждениях, г) лиц, страдающих сердечными или респираторными заболеваниями (в комбинации с вакцинацией), д) усиления эффекта вакцинации в период высокого риска или при появлении новых штаммов вируса гриппа А, е) невакцинированного персонала учреждений, обслуживающих население в период эпидемической вспышки, и ж) больных с симптомами гриппа А в течение 48 ч от момента появления симптомов при наличии у них сопутствующих заболеваний.

Другие противовирусные вещества

Арилдон

Арилдон [97] — плохо растворимый в воде феноксилдикетон — обладает активностью *in vitro* против различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, однако до настоящего времени он испытан только при местном лечении заболеваний, вызываемых HSV. Для этой цели арилдон используют в виде раствора в полиэтиленгликоле или ДМСО или в виде эмульсионного крема. Опыты на животных и предварительные испытания в клинике дали положительные результаты, которые позволяют предположить, что препарат подавляет раздевание вируса.

Фосфоноуксусная и фосфономуравьиная кислоты

Фосфоноуксусная и фосфономуравьиная кислоты избирательно подавляют ДНК-полимеразу HSV [33, 117], правда, соответствующая мутация гена этого фермента может придать ему устойчивость к ним. Ингибирующая активность препара-

тов наблюдалась также против других герпесвирусов, в том числе CMV [212]. Фосфономуравьиная кислота угнетает также ДНК-полимеразу вируса гепатита В [82] и обратную транскриптазу ретровирусов. До настоящего времени исследования проводились *in vivo* главным образом на животных; они показали, что фосфоноуксусная кислота обладает значительной системной токсичностью, тогда как фосфономуравьиная кислота переносится животными лучше. Накопление фосфонатов в костях осложняет лечение этими кислотами, так как не исключены отрицательные побочные эффекты накопленных солей. Местное применение этих препаратов было успешным на животных при кожных поражениях HSV [3, 95]; начаты клинические испытания фосфономуравьиной кислоты при генитальной герпетической инфекции.

Метисазон

Метисазон (N-метилизатин- β -тиосемикарбозон) — это один из представителей класса препаратов с противовирусной активностью, направленной на поксвирусы, который имеет сейчас главным образом исторический интерес. Механизм его действия остается неясным; по-видимому, препарат действует на относительно поздние стадии репликации вируса, после начала репликации вирусной ДНК. В те времена, когда оспа еще была широко распространена в Индии, в полевых испытаниях показали эффективность метисазона в предотвращении оспы у лиц, контактировавших с больными [15]. Однако этот результат был получен далеко не во всех испытаниях; в некоторых он оказался отрицательным [81]. Не удалось получить улучшения у больных оспой в клинике. Сообщалось об эффективном использовании метисазона для лечения осложнений при противооспенной вакцинации, однако эти испытания плохо контролировались [124]. В качестве побочного эффекта препарата часто бывает рвота, поэтому его применяют дробными дозами по два или более раз в день.

Заключение

В настоящее время разработана клиническая противовирусная терапия, и, вероятно, со временем она будет играть все более важную роль. Когда в местных больницах станет больше клинических лабораторий быстрой диагностики, появится возможность более тщательного лечения вирусологических больных. В целях лучшего подбора противовирусных препаратов необходимо детально изучать естественное течение вирусных заболеваний. Нет сомнений, что в будущем при расшире-

нии использования противовирусных препаратов возникнут новые проблемы, связанные с устойчивостью к ним вирусов, а также побочными эффектами. Новые данные, очевидно, изменяют представления о соотношении риска и пользы для индивидуальным больных. Использование противовирусных препаратов в будущем, вероятно, будет сопряжено со сложностями, характерными для использования антибиотиков в настоящее время. Качество лечения больных будет зависеть от успешного решения этих проблем, однако даже сейчас ясно, что общественные меры по охране здоровья или вакцинация — далеко не единственный подход к борьбе с вирусными инфекциями человека.

Литература

1. Abel R., Kaufman H. E., Sugar J. (1975). Effect of intravenous adenine arabinoside on herpes simplex keratouveitis in humans. In: Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent, ed. by D. Pavan-Langston, P. A. Buchanan, and C. A. Alford, pp. 393—400, Raven Press, New York.
2. Adams H. G., Benson E. A., Alexander E. R., Vontver L. A., Remington M. A., Holmes K. K. (1976). Genital herpetic infection in men and women: Clinical course and effect of topical adenine arabinoside, *J. Infect. Dis.*, **133A**, 151—159.
3. Alenius S., Berg M., Broberg F., Eklind K., Lindborg B., Oberg B. (1982). Therapeutic effects of foscarnet sodium and acyclovir on cutaneous infections due to herpes simplex type 1 in guinea pigs, *J. Infect. Dis.*, **145**, 569—573.
4. Allaudeen H. S., Kozarich J. W., Bertino J. R., DeClercq E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2698—2702.
5. Amon R. B., Hanifin J. M. (1976). Allergic contact dermatitis due to idoxuridine, *N. Engl. J. Med.*, **294**, 956—957.
6. Arvin A. M., Yeager A. S., Merigan T. C. (1976). Effect of leukocyte interferon on urinary excretion of cytomegalovirus by infants, *J. Infect. Dis.*, **133** (Suppl.), A205—A210.
7. Arvin A. M., Schmidt N. J., Cantell K., Merigan T. C. (1982). Alpha interferon administration to infants with congenital rubella, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 259—261.
8. Arvin A. M., Kushner J. H., Feldman S., Baehner R. L., Hammond D., Merigan T. C. (1982). Human leukocyte interferon for the treatment of varicella in children with cancer, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 761—765.
9. Attallah A. M., Zoon K., Folks T., Huntington J., Yeatman T. J. (1981). Multiple biological activities of homogeneous alpha interferon, *Infect. Immunol.*, **34**, 1068—1070.
10. Baglioni C., Benveniste S., Maroney P. A., Minks M. A., Nilsen T. W., West D. K. (1980). Interferon-induced enzymes: activation and role in the antiviral state, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **350**, 497—509.
11. Balfour H. H., Bean B., Mitchell C. D., Sachs G. W., Boen J. R., Edelman C. K. (1982). Acyclovir in immunocompromised patients with cytomegalovirus disease, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 241—248.
12. Bartran C. R., Henke J., Treuner J., Basler M., Esch A., Mortier W. (1982). Subacute sclerosing panencephalitis in a brother and sister. Therapeutic trial of fibroblast interferon, *Eur. J. Pediatr.*, **138**, 187—190.

13. Bassendine M. F., Chadwick R. G., Salmeron J., Shipton U., Thomas H. C., Sherlock S. (1981). Adenine arabinoside therapy in HBsAg-positive chronic liver disease: A controlled study, *Gastroenterology*, **80**, 1016—1022.
14. Bauer D. J. (1982). Treatment of plantar warts with acyclovir, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 313—314.
15. Bauer D. J., St. Vincent L., Kempe C. H., Downie A. W. (1969). Prophylaxis of smallpox with methisazone, *Am. J. Epidemiol.*, **90**, 130—145.
16. Bean B., Braun C., Balfour H. H. (1982). Acyclovir therapy for acute herpes zoster, *Lancet*, **2**, 118—121.
17. Bierman S. M., Kirkpatrick W., Fernandez H. (1981). Clinical efficacy of ribavirin in the treatment of genital herpes simplex virus infection, *Chemotherapy*, **27**, 139—145.
18. Billiau A. (1981). Interferon therapy: Pharmacokinetic and pharmacological aspects, *Arch. Virol.*, **67**, 121—133.
19. Billiau A., Joniau M., DeSomer P. (1973). Mass production of human interferon in diploid cells stimulated by poly(I)·poly(C), *J. Gen. Virol.*, **19**, 1—8.
20. Billiau A., DeSomer P., Edy V. G., DeClercq E., Heremans H. (1979). Human fibroblast interferon for clinical trials: Pharmacokinetics and tolerability in experimental animals and humans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 56—63.
21. Biron K. K., Elion G. B. (1980). The in vitro susceptibility of varicella-zoster virus to acyclovir, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 443—447.
22. Biron K. K., Fyfe J. A., Noblin J. E., Elion G. B. (1982). Selection and preliminary characterization of acyclovirresistant mutants of varicella-zoster virus, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 383—386.
23. Boston Interhospital Virus Study Group and NIAID-Sponsored Cooperative Antiviral Clinical Study (1975). Failure of high dose 5-iodo-2'-deoxyuridine in the therapy of herpes simplex virus encephalitis, *N. Engl. J. Med.*, **292**, 599—603.
24. Boulter E. A., Thornton B., Bauer D. J., Bye A. (1980). Successful treatment of experimental B virus (*Herpesvirus simiae*) infection with acyclovir, *Br. Med. J.*, **280**, 681—683.
25. Brigden D., Bye A., Fowle A. S. E. (1981). Human pharmacokinetics of acyclovir (an antiviral agent) following rapid intravenous injection, *J. Antimicrob. Chemother.*, **7**, 399—404.
26. Bryson Y. J., Monahan C., Pollack M., Shields W. D. (1980). A prospective double-blind study of side effects associated with the administration of amantadine for influenza A virus prophylaxis, *J. Infect. Dis.*, **141**, 543—547.
27. Burns W. H., Saral R., Santos G. W., Laskin O. L., Lietman P. S., McLaren C., Barry D. W. (1982). Isolation and characterization of resistant herpes simplex virus after acyclovir therapy, *Lancet*, **2**, 421—423.
28. Cantell K., Hirvonen S. (1977). Preparation of human leukocyte interferon for clinical use, *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 138—141.
29. Carmine A. A., Brogden R. N., Heel R. C., Speight T. M., Avery G. S. (1982). Trifluridine: A review of its antiviral activity and therapeutic use in the topical treatment of viral eye infections, *Drugs*, **23**, 329—353.
30. Centers of Disease Control (1983). Imported human rabies, *U. S. Morbidity and Mortality Weekly Report*, **32**, 78—86.
31. Cheeseman S. H., Henle W., Rubin R. H., Tolckoff-Rubin N. E., Cosimi B., Cantell K., Winkle S., Herrin J. T., Black P. H., Russell P. S., Hirsch M. S. (1980). Epstein-Barr virus infection in renal transplant recipients. Effect of antithymocyte globulin and interferon, *Ann. Intern. Med.*, **93**, 39—42.
32. Cheeseman S. H., Rubin R. H., Stewart J. A., Tolckoff-Rubin N. E., Cosimi A. B., Cantell K., Gilbert J., Winkle S., Herrin J. T., Black P. H., Russell P. S., Hirsch M. S. (1979). Controlled clinical trial of prophylactic hu-

- man-leukocyte interferon in renal transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **300**, 1345—1349.
33. Cheng Y. C., Grill S., Derse D., Chen J. Y., Caradonna S. J., Connor K. (1981). Mode of action of phosonoformate as an anti-herpes simplex virus agent, *Biochim. Biophys. Acta*, **652**, 90—98.
 34. Ch'ien L. T., Cannon N. J., Charamella L. J., Dismukes W. E., Whitley R. A., Buchanan R. A., Alford C. A. (1973). Effect of adenine arabinoside on severe Herpesvirus hominis infections in man, *J. Infect. Dis.*, **128**, 658—663.
 35. Ch'ien L. T., Cannon N. J., Whitley R. J., Diethelm A. G., Dismukes W. E., Scott C. W., Buchanan R. A., Alford C. A. (1984). Effect of adenine arabinoside on cytomegalovirus infections, *J. Infect. Dis.*, **130**, 32—39.
 36. Chou S., Gallagher J. G., Merigan T. C. (1981). Controlled clinical trial of intravenous acyclovir in hearttransplant patients with mucocutaneous herpes simplex infections, *Lancet*, **1**, 1392—1394.
 37. Coen D. M., Schaffer P. A. (1980). Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2265—2269.
 38. Coen D. M., Furman P. A., Gelep P. T., Schaffer P. A. (1982). Mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer resistance to 9-beta-D-arabinofuranosyladenine, *J. Virol.*, **41**, 909—918.
 39. Colby B. M., Shaw J. E., Elion G. B., Pagano J. S. (1980). Effect of acyclovir [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine] on Epstein-Barr virus DNA replication, *J. Virol.*, **34**, 560—568.
 40. Collins P., Oliver N. M. (1982). Acyclovir treatment of cutaneous herpes in guinea pigs and herpes encephalitis in mice, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. IA), 96—99.
 41. Collum L. M., Benedict-Smith A., Hillary I. B. (1980). Randomised double-blind trial of acyclovir and idoxuridine in dendritic corneal ulceration, *Br. J. Ophthalmol.*, **64**, 766—769.
 42. Connor J. D., Sweetman L., Carey S., Stuckey M. A., Buchanan R. (1975). Susceptibility in vitro of several large DNA viruses to the antiviral activity of adenine arabinoside and its metabolite, hypoxanthine arabinoside: Relation to human pharmacology. In: *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*, ed. by D. Pavan-Langston, R. A. Buchanan, and C. A. Alford, pp. 177—196, Raven Press, New York.
 43. Corey L., Nahmias A. J., Guinan M. E., Benedetti J. K., Critchlow C. W., Holmes K. K. (1982). A trial of topical acyclovir in genital herpes simplex virus infections, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 1313—1319.
 44. Cornell C. J., Smith K. A., Cornwell G. G., Burke G. P., McIntyre O. R. (1976). Systemic effects of intravenous polyriboinosinic acid-polyribocytidylic acid in man, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 1211—1216.
 45. Coster D. J., Wilhelmus K. R., Michaud R., Jones B. R. (1980). A comparison of acyclovir and idoxuridine as treatment for ulcerative herpetic keratitis, *Br. J. Ophthalmol.*, **64**, 763—765.
 46. Creasey A. A., Bartholomew J. C., Merigan T. C. (1980). Role of GO-GI arrest in the inhibition of tumor cell growth by interferon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1471—1475.
 47. Crumpacker C. S., Chartrand P., Subak-Sharpe J. H., Wilkie N. M. (1980). Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine—Genetic and physical analysis, *Virology*, **105**, 171—184.
 48. Crumpacker C. S., Schnipper L. E., Zaia J. A., Levin M. J. (1979). Growth inhibition by acycloguanosine of herpesviruses isolated from human infections, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 642—645.
 49. Datta A. K., Colby B. M., Shaw J. E., Pagano J. S. (1980). Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5163—5166.
 50. Davies W. L., Grunert R. R., Haff R. F., McGahen J. W., Neumayer E. M.,

- Paulshock M., Watts J. C., Wood T. R., Hermann E. C., Hoffmann C. E. (1964). Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine), *Science*, **144**, 862—863.
51. DeClercq E., Zhang Z. X., Sim I. S. (1982). Treatment of experimental herpes simplex virus encephalitis with (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 421—425.
 52. DeClercq E., Descamps J., Ogata M., Shigeta S. (1982). In vitro susceptibility of varicella-zoster virus to E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine and related compounds, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 33—38.
 53. DeClercq E., Zhen-Xi Z., Descamps J., Huygen K. (1981). E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine vs. interferon in the systemic treatment of infection with herpes simplex virus of athymic nude mice, *J. Infect. Dis.*, **143**, 846—852.
 54. DeClercq E., Degreef H., Wildiers J., DeJonge G., Drochmans A., Desmaps J., DeSomer P. (1980). Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster, *Br. Med. J.*, **281**, 1178.
 55. DeClercq E., Descamps E. J., DeSomer P., Barr P. J., Jones A. S., Walker R. T. (1979). (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine: A potent and selective anti-herpes agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2947—2951.
 56. DeKoning E. W., Van Bijsterveld O. P., Cantell K. (1982). Combination therapy for dendritic keratitis with human leukocyte interferon and trifluorothymidine, *Br. J. Ophthalmol.*, **66**, 509—512.
 57. Dolin R., Reichman R. C., Madore H. P., Maynard R., Linton P. N., Webber-Jones J. (1982). A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza. A infection, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 580—584.
 58. Dunnick J. K., Galasso G. J. (1979). Clinical trials with exogenous interferon: Summary of a meeting, *J. Infect. Dis.*, **139**, 109—123.
 59. Dunnick J. K., Galasso G. J. (1980). Update on clinical trials with exogenous interferon, *J. Infect. Dis.*, **142**, 293—299.
 60. Elion G. B. (1982). Mechanism of action and selectivity of acyclovir, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 7—13.
 61. Elion G. B., Furman P. A., Fyfe J. A., DeMiranda P., Beauchamp L., Schaeffer H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5716—5720.
 62. Emodi G., O'Reilly R., Muller A., Everson L. K., Binswanger U., Just M. (1976). Effect of human exogenous leukocyte interferon in cytomegalovirus infections, *J. Infect. Dis.*, **133** (Suppl.) A199—A204.
 63. Emond R. T. D., Evans B., Bowen E. T. W., Lloyd G. (1977). A case of Ebola virus infection, *Br. Med. J.*, **2**, 541—544.
 64. Feldman S., Hughes W. T., Darlington R. W., Kim H. K. (1975). Evaluation of topical polyinosinic acid-polycytidylic acid in treatment of localized herpes zoster in children with cancer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 289—294.
 65. Field H. J. (1982). Development of clinical resistance to acyclovir in herpes simplex virus-infected mice receiving oral therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 744—752.
 66. Field H. J., Darby G. (1980). Pathogenicity in mice of strains of herpes simplex virus which are resistant to acyclovir in vitro and in vivo, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 209—216.
 67. Field H. J., Darby G., Wildy P. (1980). Isolation and characterization of acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus, *J. Gen. Virol.*, **49**, 115—124.
 68. Field H. J., Bell S. E., Elion G. B., Nash A. A., Wildy P. (1979). Effect of acycloguanosine treatment on acute and latent herpes simplex infections in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 554—561.
 69. Freeman A. I., Al-Bussan N., O'Malley J. A., Stutzman L., Bjornsson S.,

- Coster W. A. (1977). Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man, *J. Med. Virol.*, **1**, 79—93.
70. Galbraith A. W., Oxford J. S., Schild G. C., Potter C. W., Watson G. I. (1971). Therapeutic effect of 1-adamantanamine hydrochloride in naturally occurring influenza A2/Horn Kong infection, *Lancet*, **2**, 113—115.
 71. Greenberg H. B., Pollard R. B., Lutwick L. I., Gregory P. B., Robinson W. S., Merigan T. C. (1976). Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis, *N. Engl. J. Med.*, **295**, 517—522.
 72. Gutterman J. U., Fine S., Quesada J., Horning S. J., Levine J. F., Alexanian R., Rerhnardt L., Kramer H., Spiegel H., Colburn W. (1982). Recombinant leukocyte A interferon: Pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biological effects in cancer patients, *Ann. Intern. Med.*, **96**, 549—556.
 73. Haglund S., Lundquist P. G., Cantell K., Strander H. (1981). Interferon therapy in juvenile laryngeal papillomatosis, *Arch. Otolaryngol.*, **107**, 327—332.
 74. Hanto D. W., Frizzera G., Gajl-Peczalska K. J., Sakamoto K., Purtilo D. T., Balfour H. H., Simmons R. L., Najarian J. S. (1982). Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation, *N. Engl. J. Med.*, **306**, 913—918.
 75. Harmon M. W., Janis B. (1976). Effects of cytosine arabinoside, adenine arabinoside, and 6-azauridine on rabies virus in vitro and in vivo, *J. Infect. Dis.*, **133**, 7—13.
 76. Hatcher V. A., Friedman-Kien A. E., Marcus E. L., Klein R. J. (1982). Arabinosyladenine monophosphate in genital herpes: a double-blind placebo-controlled study, *Antiviral. Res.*, **2**, 283—290.
 77. Havell E. A., Yip Y. K., Vilcek J. (1978). Characteristics of human lymphoblastoid (Namalva) interferon, *J. Gen. Virol.*, **38**, 51—59.
 78. Hayden F. G., Hall W. J., Douglas R. G. (1980). Therapeutic effects of aerosolized amantadine in naturally acquired interferon due to influenza A virus, *J. Infect. Dis.*, **141**, 535—542.
 79. Hayden F. G., Hall W. J., Douglas R. G. (1980). Therapeutic effects of aerosolized amantadine in naturally acquired infection due to influenza A virus, *J. Infect. Dis.*, **141**, 535—542.
 80. Hayden F. G., Gwaltney J. M., Van de Castle R. L., Adams K. F., Giordani B. (1981). Comparative toxicity of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in healthy adults, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 226—233.
 81. Heiner G. G., Fatima N., Russell P. K., Haase A. T., Ahmad N., Mohammed N., Thomas D. B., Mack T. M., Khan M. M., Knatterud G. L., Anthony R. L., McCrumb F. R. (1971). Field trials of methisazone as a prophylactic agents against smallpox, *Am. J. Epidemiol.*, **94**, 435—449.
 82. Hess G., Arnold W., Meyer zum Buschenfelde K. H. (1980). Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by phosphonoformate: studies on its mode of action, *J. Med. Virol.*, **5**, 309—316.
 83. Hilfenhaus J., Karges H. E., Weinmann E., Barth R. (1975). Effect of administered human leukocyte interferon on experimental rabies in monkeys, *Infect. Immunol.*, **11**, 1156—1158.
 84. Holmes A. R., Rasmussen L., Merigan T. C. (1978). Factors affecting the interferon sensitivity of human cytomegalovirus, *Intervirology*, **9**, 48—55.
 85. Horning S. J., Levine J. F., Miller R. A., Rosenberg S. A., Merigan T. C. (1982). Clinical and immunologic effects of recombinant leukocyte A interferon in eight patients with advanced cancer, *J. A. M. A.*, **247**, 1718—1722.
 86. Hyndiuk R. A., Okumoto M., Damiano R. A., Valenton M., Smolin G. (1976). Treatment of vaccinal keratitis with vidarabine, *Arch. Ophthalmol.*, **94**, 1363—1364.
 87. Jahrling P. B., Hesse R. A., Eddy G. A., Johnson K. M., Callis R. T., Ste-

- phen E. L. (1980). Lassa virus infection of rhesus monkeys: Pathogenesis and treatment with ribavirin, *J. Infect. Dis.*, **141**, 580—589.
88. Jain S., Thomas H. C., Oxford J. S., Sherlock S. (1978). Trial of ribavirin for the treatment of HBsAg positive chronic liver disease, *J. Antimicrob. Chemother.*, **4**, 367—373.
 89. Jones B. R., Coster D. J., Falcon M. G., Cantell K. (1976). Topical therapy of ulcerative herpetic keratitis with human interferon, *Lancet*, **2**, 128.
 90. Jones B. R., Coster D. J., Fison P. N., Thompson G. M., Cobo L. M., Falcon M. G. (1979). Efficacy of acycloguanosine (Wellcome 248U) against herpes-simplex corneal ulcers, *Lancet*, **1**, 243—244.
 91. Kaufman H. E., Ellison E. D., Townsend W. M. (1970). The chemotherapy of herpes iritis with adenine arabinoside and cytarabine, *Arch. Ophthalmol.*, **84**, 783—787.
 92. Kaufman H. E., Martola E., Dohlman L. (1962). Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in the treatment of herpes simplex keratitis, *Arch. Ophthalmol.*, **68**, 235—239.
 93. Kaufman H. E., Varnell E. D., Centifanto Y. M., Rheinstrom S. D. (1978). Effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine on herpesvirus-induced keratitis and iritis in rabbits, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 842—845.
 94. Keeney R. E., Kirk L. E., Bridgen D. (1982). Acyclovir tolerance in humans, *Am. J. Med.*, **73** (suppl. 1A), 176—181.
 95. Kern E. R., Richards J. T., Overall J. C., Glasgow L. A. (1981). A comparison of phosphonoacetic acid and phosphonoformic acid activity in genital herpes simplex virus type 1 and type 2 infections of mice, *Antiviral Res.*, **1**, 225—235.
 96. Kerr I. M., Brown R. E. (1978). pppA2'p5'A2'p5'A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 256—260.
 97. Kim K. S., Sapienza V. J., Carp R. I. (1980). Antiviral activity of arildone on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 276—280.
 98. Kinkel A. W., Buchanan R. A. (1975). Human pharmacology. In: Adenine Arabinoside: An Antiviral agent, ed. by D. Pavan-Langston, R. A. Buchanan, and C. A. Alford, Raven Press, New York, pp. 197—204.
 99. Klein R. J., Friedman-Klein A. E., Brady E. (1974). Herpes simplex virus skin infection in hairless mice: Treatment with antiviral compounds, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**, 318—322.
 100. Klein R. J., Friedman-Klein A. E., DeStefano E. (1979). Latent herpes simplex virus infections in sensory ganglia of hairless mice prevented by acycloguanosine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 723—729.
 101. Klein R. J., DeStefano E., Friedman-Klein A. E., Brady E. (1981). Effect of acyclovir on latent herpes simplex virus infections in trigeminal ganglia of mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 937—939.
 102. Knight V., Fedson D., Baldini J., Douglas R. G., Couch R. B. (1970). Amantadine therapy of epidemic influenza A2 (Hong Kong), *Infect. Immunol.*, **1**, 200—204.
 103. Knight V., McClug H. W., Wilson S. Z., Waters B. K., Quarles J. M., Cameron R. W., Gregg S. E., Zerwas J. M., Couch R. B. (1981). Ribavirin small-particle aerosol treatment of influenza, *Lancet*, **2**, 945—949.
 104. Koplan J. P., Monsur K. A., Foster S. O., Hug F., Rahaman M. M., Huq S., Buchanan R. A., Ward N. A. (1975). Treatment of variola major with adenine arabinoside, *J. Infect. Dis.*, **131**, 34—39.
 105. Kovanen J., Haltia M., Cantell K. (1980). Failure of interferon to modify Creutzfeldt-Jacob disease, *Br. Med. J.*, **280**, 292.
 106. Kurtz S. M. (1975). Toxicology of adenine arabinoside. In: Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent, ed. by D. Pavan-Langston, R. A. Buchanan, and C. A. Alford, Raven Press, New York, pp. 145—157.

107. Kurtz S. M., Fitzgerald J. E., Schardein J. L. (1977). Comparative animal toxicology of vidarabine and its 5'-monophosphate, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**, 6—8.
108. La Lau C., Oosterhuis J. A., Versteeg J., van Rij G., Renardel de Lavalette J. G., Craandijk A., Lamers W. R., Mierlobensteyn T. (1982). Multicenter trial of acyclovir and trifluorothymidine in herpetic keratitis, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 305—306.
109. Larsson A., Forsgren M., Hard af Segerstad S., Stander H., Cantell K. (1976). Administration of interferon to an infant with congenital rubella syndrome involving persistent viremia and cutaneous vasculitis, *Acta Paediatr. Scand.*, **65**, 105—110.
110. Laskin O. L., Seral R., Burns W. H., Angelopoulos C. M., Lietman P. S. (1982). Acyclovir concentrations and tolerance during repetitive administration for 18 days, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 221—224.
111. Laskin O. L., Longstreth J. A., Saral R., DeMiranda P., Keeney R., Lietman P. S. (1982). Pharmacokinetics and tolerance of acyclovir, a new anti-herpesvirus agent, in humans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 393—398.
112. Laskin O. L., DeMiranda P., King D. H., Page D. A., Longstreth J. A., Rocco L., Lietman P. S. (1982). Effects of probenecid on the pharmacokinetics and elimination of acyclovir in humans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 804—807.
113. Laskin O. L., Longstreth J. A., Whellon A., Rocco L., Lietman P. S., Krasny H. C., Keeney R. E. (1982). Acyclovir kinetics in end-stage renal disease, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **31**, 594—601.
114. Levin M. J., Leary P. L. (1981). Inhibition of human herpesviruses by combinations of acyclovir and human leukocyte interferon, *Infect. Immunol.*, **32**, 995—999.
115. Levin M. J., Larny P. L., Arbeit R. D. (1980). Effect of acyclovir on the proliferation of human fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 947—953.
116. Levine A. S., Sivulich M., Wiernik P. H., Levy H. B. (1979). Initial clinical trials in cancer patients of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid stabilized with poly-L-lysine, in carboxymethylcellulose [poly(ICLC)], a highly effective interferon inducer, *Cancer Res.*, **39**, 1645—1650.
117. Lienbach S. S., Reno J. M., Lee L. F., Isbell A. F., Boezi J. A. (1976). Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase, *Biochemistry*, **15**, 426—430.
118. Lopez Z., Watanabe K. A., Fox J. J. (1980). 2'-Fluoro-5-iodo-aracytosin, a potent and selective anti-herpesvirus agent, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 803—806.
119. MacCallum F. O., Juel-Jensen B. E. (1966). Herpes simplex: virus skin infection in man treated with idoxuridine in dimethyl sulphonyde: results of a double-blind controlled trial, *Br. Med. J.*, **2**, 805—807.
120. Marker S. C., Howard R. J., Groth K. E., Mastri A. R., Simmons R. L., Balfour H. H. (1980). A trial of vidarabine for cytomegalovirus infection in renal transplant patients, *Arch. Intern. Med.*, **140**, 1441—1444.
121. Maudgal P. C., Uyttebroeck W., DeClercq E., Missotten L. (1982). Oral and topical treatment of experimental herpes simplex iritis with bromovinyldeoxyuridine, *Arch. Ophthalmol.*, **100**, 1337—1340.
122. Maudgal P. C., DeClercq E., Descamps J., Missotten L., Wijnhoven J. (1982). Experimental stroma herpes simplex keratitis. Influence of treatment with topical bromovinyldeoxyuridine and trifluridine, *Arch. Ophthalmol.*, **100**, 653—656.
123. McGahen J. W., Hoffmann C. E. (1968). Influenza infections of mice. I. Curative activity of amantadine HCl, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**, 678—681.
124. McLean D. M. (1977). Methisazone therapy in pediatric vaccinia complications, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **284**, 118—121.

125. McPherson T. A., Tan Y. H. (1980). Phase I pharmacotoxicology study of human fibroblast interferon in human cancers, *J. Natl. Cancer, Inst.*, **65**, 75—79.
126. Merigan T. C. (1977). Pharmacokinetics and side effects of interferon in man, *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 541—547.
127. Merigan T. C., Reed S. E., Hall T. S., Tyrrell D. A. J. (1973). Inhibition of respiratory virus infection by locally applied interferon, *Lancet*, **1**, 563—567.
128. Merigan T. C., Gallagher J. G., Pollard R. B., Arvin A. M. (1981). Short-course human leukocyte interferon in treatment of herpes zoster in patients with cancer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 193—195.
129. Merigan T. C., Rand K. H., Pollard R. B., Abdallah P. S., Jordan G. W., Fried R. P. (1978). Human leukocyte interferon for the treatment of herpes zoster in patients with cancer, *N. Engl. J. Med.*, **298**, 981—987.
130. Meyers J. D., McGuffin R. W., Bryson Y. J., Cantell K., Thomas E. D. (1982). Treatment of cytomegalovirus pneumonia after marrow transplant with combined vidarabine and human leukocyte interferon, *J. Infect. Dis.*, **146**, 80—84.
131. Meyers J. D., McGuffin R. W., Neiman P. E., Singer J. W., Thomas E. D. (1980). Toxicity and efficacy of human leukocyte interferon for the treatment of cytomegalovirus pneumonia after marrow transplantation, *J. Infect. Dis.*, **141**, 555—562.
132. Meyers J. D., Wade J. C., Mitchell C. D., Saral R., Lietman P. S., Durack D. T., Levin M. J., Segreti A. C., Balfour H. H. (1982). Multicenter collaborative trial of intravenous acyclovir for treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infection in the immunocompromised host, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 229—235.
133. Mindel A., Adler M. W., Sutherland S., Fiddian A. P. (1982). Intravenous acyclovir treatment for primary genital herpes, *Lancet*, **1**, 697—700.
134. Mitchel C. D., Bean B., Gentry S. R., Groth K. E., Boen J. R., Balfour H. H. (1981). Acyclovir therapy for mucocutaneous herpes simplex infections in immunocompromised patients, *Lancet*, **1**, 1389—1392.
135. Monto A. S., Gunn R. A., Bandyk M. G., King C. L. (1979). Prevention of Russian influenza by amantadine, *J. A. M. A.*, **241**, 1003—1007.
136. McGuffin R. W., Shiota F. M., Meyers J. D. (1980). Lack of toxicity of acyclovir to granulocyte progenitor cells in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 471—473.
137. Myers M. G., Oxman M. N., Clark J. E., Arndt K. A. (1975). Failure of neutral-red photodynamic inactivation in recurrent herpes simplex infections, *N. Engl. J. Med.*, **293**, 945—949.
138. Nagata S., Taira H., Hall A., Johnsrud L., Streuli M., Ecsodi J., Boll W., Cantell K., Weissman C. (1980). Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity, *Nature*, **284**, 316—320.
139. Nahmias A., Kerrick G., Keyserling H. L., Davis G., Alexander J., Corey L., Hatcher V., Luby J., Mills J., Sachs S. (1982). Patient-initiated therapy for recurrent genital herpetic infections, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 342—346.
140. Nilssen A. E., Aasen T., Halsos A. M., Kinge B. R., Tjøtta E. A. L., Wikstrom K., Fiddian A. P. (1982). Efficacy of oral acyclovir in the treatment of initial and recurrent genital herpes, *Lancet*, **2**, 571—573.
141. Olding-Stenkvist E., Forsgren M., Hanley D., Kreuger A., Lundmark K. M., Nilsson A., Wadell G. (1982). Measles encephalopathy during immunosuppression: failure of interferon treatment, *Scand. J. Infect. Dis.*, **14**, 1—4.
142. Oxford J. S., Galbraith A. (1980). Antiviral activity of amantadine: a review of laboratory and clinical data, *Pharmacol. Ther.*, **11**, 181—262.
143. Park N. H., Pavan-Langston D., McLean S. L., Albert D. M. (1979). Therapy of experimental herpes simplex encephalitis with acyclovir in mice, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 775—779.

144. *Parker L. M., Lipton J. M., Binder N., Crawford E. L., Kudisch M., Levin M. J.* (1982). Effect of acyclovir and interferon on human hematopoietic progenitor cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 146—150.
145. *Pavan-Langston D., Buchanan R. A.* (1976). Vidarabine therapy of simple and IDU-complicated herpetic keratitis, *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, **81**, OP813—OP825.
146. *Pavan-Langston D., Lass J., Hettinger M., Udell I.* (1981). Acyclovir and vidarabine in the treatment of ulcerative herpes simplex keratitis, *Am. J. Ophthalmol.*, **92**, 829—835.
147. *Pazin G. J., Armstrong J. A., Lam M. T., Tarr G. C., Jannetta P. J., Ho M.* (1979). Prevention of reactivated herpes simplex infection by human leukocyte interferon after operation on the trigeminal root, *N. Engl. J. Med.*, **301**, 225—230.
148. *Pazin G. J., Ho M., Haverkos H. W., Armstrong J. A., Breinig M. C., Wechsler H. L., Arvin A., Merigan T. C., Cantell K.* (1982). Effects of interferon-alpha on human warts, *J. Interferon Res.*, **2**, 235—243.
149. *Peterslund N. A., Seyer-Hansen K., Ipsen J., Esmann V., Schonheyder H., Juhl H.* (1981). Acyclovir in herpes zoster, *Lancet*, **2**, 827—830.
150. *Pollard R. B., Egbert P. R., Gallagher J. G., Merigan T. C.* (1980). Cytomegalovirus retinitis in immunosuppressed hosts. I. Natural history and effects of treatment with adenine arabinoside, *Ann. Intern. Med.*, **93**, 655—664.
151. *Pollard R. B., Gregory P. B., Merigan T. C., Neal E. A., Robinson W. S., Smith J. L.* (1978). Effect of vidarabine on chronic hepatitis B virus infection, *J. A. M. A.*, **239**, 1648—1650.
152. *Priestman T. J.* (1980). Initial evaluation of human lymphoblastoid interferon in patients with advanced malignant disease, *Lancet*, **2**, 113—118.
153. *Prober C. G., Kirk L. E., Keeney R. E.* (1982). Acyclovir therapy of chickenpox in immunosuppressed children—A collaborative study, *J. Pediatr.*, **101**, 622—625.
154. *Quarles J. M., Couch R. B., Cate T. R., Goswick C. B.* (1981). Comparison of amantadine and rimantadine for prevention of type A (Russian) influenza, *Antiviral Res.*, **1**, 149—155.
155. *Rand K. H., Johnson K. P., Rubinstein L. J., Wolinsky J. S., Penny J. B., Walker D. L., Padgett B. L., Merigan T. C.* (1977). Adenine arabinoside in the treatment of progressive leukoencephalopathy: Use of virus-containing cells in the urine to assess response to therapy, *Ann. Neurol.*, **1**, 458—462.
156. *Rasmussen L., Holmes A. R., Hofmeister B., Merigan T. C.* (1977). Multiplicity-dependent replication of varicella-zoster virus in interferon-treated cells, *J. Gen. Virol.*, **35**, 361—368.
157. *Reeves W. C., Corey L., Adams H. G., Vontver L. A., Holmes K. K.* (1981). Risk of recurrence after first episodes of genital herpes, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 315—319.
158. *Romano A., Revel M., Guarari-Rotman D., Blumenthal M., Stein R.* (1980). Use of human fibroblast-derived (beta) interferon in the treatment of epidemic adenovirus keratokconjunctivitis, *J. Interferon Res.*, **1**, 95—100.
159. *Sabin A. B.* (1978). Amantadine and influenza: Evaluation of conflicting reports, *J. Infect. Dis.*, **138**, 557—566.
160. *Sacks S. L., Scullard G. H., Pollard R. B., Gregory P. B., Robinson W. S., Merigan T. C.* (1982). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection: Pharmacokinetics and side effects of interferon and adenine arabinoside alone and in combination, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 95—100.
161. *Saito Y., Price R. W., Rottenberg D. A., Fox J. J., Su T. L., Watanabe K. A., Philips F. S.* (1982). Quantitative autoradiographic mapping of herpes simplex virus encephalitis with a radiolabeled antiviral drug, *Science*, **217**, 1151—1153.
162. *Saral R., Burns W. H., Laskin O. L., Santos G. W., Lietman P. S.* (1981). Acyclovir prophylaxis of herpes simplex virus infections: A randomized do-

- uble-blind, controlled trial in bone marrow transplant recipient, *N. Engl. J. Med.*, **305**, 63—67.
163. Schimpff S. C., Fortner C. L., Greene W. H., Wiernik P. H. (1974). Cytosine arabinoside for localized herpes zoster in patients with cancer: Failure in a controlled trial, *J. Infect. Dis.*, **130**, 673—676.
 164. Schmidt A., Chernajovsky Y., Shulman L., Federman P., Berissi H., Revel M. (1979). An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'-5')oligoisoadenylate and the C—C—A terminus of tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4788—4792.
 165. Schnipper L. E., Crumpacker C. S. (1980). Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine: Role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2270—2273.
 166. Schnipper L. E., Crumpacker C. S., Marlowe S. I., Kowalsky P., Hershey B. J., Levin M. J. (1982). Drug-resistant herpes simplex virus in vitro and after acyclovir treatment in an immunocompromised patient, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 387—392.
 167. Schulman J. L. (1968). Effect of amantadine-HCl and rimantadine-HCl on transmission of influenza virus infection in mice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**, 1173—1178.
 168. Scott G. M., Philpotts R. J., Wallace J., Gauci C. L., Greiner J., Tyrrell D. A. (1982). Prevention of rhinovirus colds by human interferon alpha-2 from *Escherichia coli*, *Lancet*, **2**, 186—188.
 169. Scott G. M., Philpotts R. J., Wallace J., Secher D. S., Cantell K., Tyrrell D. A. (1982). Purified interferon as protection against rhinovirus infection, *Br. J. Med.*, **284**, 1822—1826.
 170. Scott G. M., Secher D. S., Flowers D., Bate J., Cantell K., Tyrrell D. A. (1981). Toxicity of interferon, *Br. J. Med.*, **282**, 1345—1348.
 171. Scullard G. H., Greenberg H. B., Smith J. L., Gregory P. B., Merigan T. C., Robinson W. S. (1982). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection: Infectious virus cannot be detected in patient serum after permanent responses to treatment, *Hepatology*, **2**, 39—49.
 172. Scullard G. H., Pollard R. B., Smith J. L., Sacks S. L., Gregory P. B., Robinson W. S., Merigan T. C. (1981). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection. I. Changes in viral markers with interferon combined with adenine arabinoside, *J. Infect. Dis.*, **143**, 772—783.
 173. Scullard G. H., Andres L. L., Greenberg H. B., Smith J. L., Sawhney V. K., Neal E. A., Mahal A. S., Popper H., Merigan T. C., Robinson W. S., Gregory P. B. (1981). Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection: Improvement in liver disease with interferon and adenine arabinoside, *Hepatology*, **1**, 228—232.
 174. Sen G. C., Shaila S., Lebleu B., Brown G. E., Desrosiers R. C., Lengyel P. (1977). Impairment of reovirus mRNA methylation in extracts of interferon-treated Erlich ascites tumor cells: Further characteristics of the phenomenon, *J. Virol.*, **21**, 69—83.
 175. Shannon W. M. (1975). Adenine arabinoside: Antiviral activity in vitro. In: Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent, ed. by D. Pavan-Langston, R. A. Buchanan, and C. A. Alford, Raven Press, New York, pp. 1—43.
 176. Sherwin A., Knost J. A., Fein S., Abrams P. G., Foon K. A., Ochs J. J., Schoenberger C., Maluish A. E., Oldham R. K. (1982). A multiple-dose phase I trial of recombinant leukocyte A interferon in cancer patients, *J. A. M. A.*, **248**, 2461—2466.
 177. Sibrack C. D., McLaren C., Barry D. W. (1982). Disease and latency characteristics of clinical herpes virus isolated after acyclovir therapy, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 372—375.
 178. Sidwell R. W., Huffman J. H., Khare G. P., Allen L. B., Witkowski J. T., Robins R. K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1-Beta-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide, *Science*, **177**, 705—706.

179. *Silvestri D. L., Corey L., Holmes K. K.* (1982). Ineffectiveness of topical idoxuridine in dimethyl sulfoxide for therapy for genital herpes, *J. A. M. A.*, **248**, 953—959.
180. *Skehel J. J., Hay A. J., Armstrong J. A.* (1977). On the mechanism of inhibition of influenza virus replication by amantadine hydrochloride, *J. Gen. Virol.*, **38**, 97—110.
181. *Sloan B. J.* (1975). Adenine arabinoside: Chemotherapy studies in animals. In: *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*, ed. by D. Pavan-Langston, R. A. Buchanan, and C. A. Alford, Raven Press, New York, pp. 45—94.
182. *Smith C. B., Charette R. P., Fox J. P., Cooney M. K., Hall C. E.* (1980). Lack of effect of oral ribavirin in naturally occurring influenza A virus (H1N1) infection, *J. Infect. Dis.*, **141**, 548—554.
183. *Smith C. I., Scullard G. H., Gregory P. B., Robinson W. S., Merigan T. C.* (1982). Preliminary studies of acyclovir in chronic hepatitis B, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 267—270.
184. *Smith C. I., Kitchen L. W., Scullard G. H., Robinson W. S., Gregory P. B., Merigan T. C.* (1982). Vidarabine monophosphate and human leukocyte interferon in chronic hepatitis B infection, *J. A. M. A.*, **247**, 2261—2265.
185. *Smith K. O., Galloway K. S., Kennell W. L., Ogilvie K. K., Radatus B. K.* (1982). A new nucleoside analog, 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxyl]methyl]guanine, highly active in vitro against herpes simplex virus types 1 and 2, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 55—61.
186. *Smorodintsev A. A., Zlydnikov D. M., Kiseleva A. M., Romanov J. A., Kazantsev A. P., Rumovsky V. I.* (1970). Evaluation of amantadine in artificially induced A2 and B influenza, *J. A. M. A.*, **213**, 1448—1454.
187. *Spector S. A., Connor J. D., Hintz M., Guinn R. P., Blum M. R., Keeney R. E.* (1981). Single-dose pharmacokinetics of acyclovir, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 608—612.
188. *Spruance S. L., Crumpacker C. S., Haines H., Bader C., Mehr K., MacCallman J., Schnipper L. E., Klauber M. R., Overall J. C.* (1979). Ineffectiveness of topical adenine arabinoside 5'-monophosphate in the treatment of recurrent herpes simplex labialis, *N. Engl. J. Med.*, **300**, 1180—1184.
189. *Spruance S. L., Schnipper L. E., Overall J. C., Kern E. R., Wester B., Modlin J., Wenerstrom G., Burton C., Arndt K. A., Chiu G. L., Crumpacker C. S.* (1982). Treatment of herpes simplex labialis with topical acyclovir in polyethylene glycol, *J. Infect. Dis.*, **146**, 85—90.
190. *St. Clair M. H., Furman P. A., Lubbers C. M., Elion G. B.* (1980). Inhibition of cellular alpha and virally induced deoxyribonucleic acid polymerases by the triphosphate of acyclovir, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 741—745.
191. *Stanwick T. L., Schinazi R. F., Campbell D. E., Nahmias A. J.* (1981). Combined antiviral effect of interferon and acyclovir on herpes simplex virus type 1 and 2, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 672—674.
192. *Stevens D. A., Jordan G. W., Waddell T. F., Merigan T. C.* (1973). Adverse effect of cytosine arabinoside on disseminated zoster in a controlled trial, *N. Engl. J. Med.*, **289**, 873—878.
193. *Stewart W. E.* (1979). *The Interferon System*, Springer-Verlag, New York.
194. *Stiehm E. R., Kronenberg L. H., Rosenblatt H. M., Bryson Y., Marigan T. C.* (1982). Interferon: Immunobiology and clinical significance, *Ann. Intern. Med.*, **96**, 80—93.
195. *Strander H., Cantell K., Carlstrom G., Jakobsson P. A.* (1973). Clinical and laboratory investigations on man: Systematic administration of potent interferon to man, *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**, 733—742.
196. *Streeter D. G., Witkowski J. T., Khare G. P., Sidwell R. W., Bauer R. J., Robins R. K., Simon L. N.* (1973). Mechanism of action of 1-beta-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad-spectrum antiviral agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1174—1178.
197. *Sullivan J. L., Byron K. S., Brewster F. E., Sakamoto K., Shaw J. E., Paga-*

- no J. S. (1982). Treatment of life-threatening Epstein-Barr virus infection with acyclovir, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 262—266.
198. Sundmacher R., Neumann-Haefelin D., Cantell K. (1976). Successful treatment of dendritic keratitis with human leukocyte interferon: A controlled clinical study, *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **201**, 39—45.
 199. Sundmacher R., Wigand R., Cantell K. (1982). The value of exogenous interferon in adenovirus keratoconjunctivitis. Preliminary results, *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **218**, 139—140.
 200. Taniguchi T., Guarente L., Roberts T. M., Kimelman D., Doughan J., Ptashne M. (1980). Expression of the human fibroblasts interferon gene in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5230—5233.
 201. Togo Y., Hornick R. B., Dawkins A. T. (1968). Studies on induced influenza in man. I. Double-blind studies designed to assess prophylactic efficacy of amantadine hydrochloride against A2/Rockville/1/65 strain, *J. A. M. A.*, **203**, 1089—1094.
 202. Togo Y., Hornick R. B., Felitti V. J., Kaufman M. L., Dawkins A. T., Kilpe V. E., Claghorn J. L. (1970). Evaluation of therapeutic efficacy of amantadine in patients with naturally occurring A2 influenza, *J. A. M. A.*, **211**, 1149—1156.
 203. Tucker W. E. (1982). Preclinical toxicology profile of acyclovir: an overview, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 27—30.
 204. Tyms A. S., Scamans E. M., Naim H. M. (1981). The in vitro activity of acyclovir and related compounds against cytomegalovirus infections, *J. Antimicrob. Chemother.*, **8**, 65—72.
 205. Tyrrell D. A. J., Bynoe M. L., Hoorn B. (1965). Studies on the antiviral activity of 1-adamantanamine HCl, *Br. J. Exp. Pathol.*, **46**, 370—375.
 206. Uylangco C. V., Beroy G. J., Santiago L. T., Mercolez V. D., Mendoza S. L. (1981). A double-blind, placebo-controlled evaluation of ribavirin in the treatment of acute measles, *Clin. Ther.*, **3**, 389—396.
 207. Vallbracht A., Treuner J., Manncke K. H., Niethammer D. (1982). Autoantibodies against human beta interferon following treatment with interferon, *J. Interferon Res.*, **2**, 107—110.
 208. Van Dyke R. B., Connor J. D., Wyborny C., Hintz M., Keeney R. E. (1982). Pharmacokinetics of orally administered acyclovir in patients with herpes progenitalis, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 172—175.
 209. Van Etta L., Brown J., Mastri A., Wilson T. (1981). Fatal vidarabine toxicity in a patient with normal renal function, *J.A.M.A.*, **246**, 1703—1705.
 210. Wade J. C., Huntz M., McGuffin R., Springmeyer S. C., Connor J. D., Meyers J. D. (1982). Treatment of cytomegalovirus pneumonia with high-dose acyclovir, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 249—256.
 211. Wade J. C., Newton B., McLaren C., Flournoy N., Keeney R. E., Meyers J. D. (1982). Intravenous acyclovir to treat mucocutaneous herpes simplex virus infection after marrow transplantation, *Ann. Intern. Med.*, **96**, 265—269.
 212. Wahren B., Oberg B. (1980). Reversible inhibition of cytomegalovirus replication by phosphonoformate, *Intervirology*, **14**, 7—15.
 213. Weimar W., Lameijer L. D. F., Ery V. G., Schellekens H. (1979). Prophylactic use of interferon in renal allograft recipients, *Transplant Proc.*, **11**, 69—70.
 214. Weimar W., Stitz L., Billiau A., Cantell K., Schellekens H. (1980). Prevention of vaccinia lesions in rhesus monkeys by human leukocyte and fibroblasts interferon, *J. Gen. Virol.*, **48**, 25—30.
 215. Weimar W., Heijink R. A., Ten Kate F. J. P., Schalm S. W., Masurel N., Schellekens H., Cantell K. (1980). Double-blind study of leukocyte interferon administration in chronic HBsAg-positive hepatitis, *Lancet*, **1**, 336—338.
 216. Whitley R., Barton N., Collins E., Whelchel J., Diethelm A. G. (1982). Mucocutaneous herpes simplex virus infections in immunocompromised patients.

- A model for evaluation of topical antiviral agents, *Am. J. Med.*, **73** (Suppl. 1A), 236—240.
217. Whitley R. J., Nahmias A. J., Soong S. J., Galasso G. G., Fleming C. L., Alford C. A. (1980). Vidarabine therapy of neonatal herpes simplex virus infection, *Pediatrics*, **66**, 495—501.
 218. Whitley R. J., Soong S. J., Dolin R., Betts R., Linnemann C., Alford C. A. (1982). Early vidarabine therapy to control the complications of herpes zoster in immunosuppressed patients, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 971—975.
 219. Whitley R. J., Soong S. J., Dolin R., Galasso G. J., Ch'ten L. T., Alford C. A., Collaborative Study Group (1977). Adenine arabinoside therapy of biopsy-proved herpes simplex encephalitis, *N. Engl. J. Med.*, **297**, 289—294.
 220. Whitley R., Hilty M., Haynes R., Bryson Y., Connor J. D., Soong S. J., Alford C. A. (1982). Vidarabine therapy of varicella in immunosuppressed patients, *J. Pediatr.*, **101**, 125—131.
 221. Whitley R. J., Soong S. J., Hirsch M. S., Karchmer A. W., Dolin R., Galasso G., Dunnick J. K., Alford C. A. NIAID Collaborative Study Group (1981). Herpes simplex encephalitis. Vidarabine therapy and diagnostic problems, *N. Engl. J. Med.*, **304**, 313—318.
 222. Whitley R. J., Tucker B. C., Kinkel A. W., Barton N. H., Pass R. F., Whelchel J. D., Cobbs C. G., Diethelm A. G., Buchanan R. A. (1980). Pharmacology, tolerance, and antiviral activity of vidarabine monophosphate in humans, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 709—715.
 223. Wildenhoff K. E., Esmann V., Ipsen J., Harving H., Peterslund N. A., Schonheyder H. (1981). Treatment of trigeminal and thoracic zoster with idoxuridine, *Scand. J. Infect. Dis.*, **13**, 257—262.
 224. Wingard J. R., Stuart R. K., Saral R., Burns W. H. (1981). Activity of trifluorothymidine against cytomegalovirus, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **20**, 286—290.
 225. Wingfield W. L., Pollack D., Grunert R. R. (1969). Therapeutic efficacy of amantadine HCl and rimantadine HCl in naturally occurring influenza A2 respiratory illness in man, *N. Engl. J. Med.*, **281**, 579—584.
 226. Young B. J., Patterson A., Ravenscroft T. (1982). A randomized double-blind clinical trial of acyclovir (Zovirax) and adenine arabinoside in herpes simplex corneal ulceration, *Br. J. Ophthalmol.*, **66**, 361—363.
 227. Zilberstein A., Kimchi A., Schmidt A., Revel M. (1978). Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: A protein kinase and an oligoisoadenylate synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4734—4738.

Противовирусная иммунизация

Брайан Мэрфи, Роберт Ченок¹

Иммунитет к вирусным инфекциям

Антигены, участвующие в формировании иммунитета

Иммунитет к вирусным инфекциям зависит от иммунного ответа на поверхностные антигены вирионов или клеток, зараженных вирусом. Ответ на присутствующие на поверхности вирионов, а также встроенные в плазматическую мембрану зараженных клеток гликопротеины или белковые антигены необходим для формирования эффективного иммунологически опосредованного уничтожения вируса или зараженных клеток. Предполагают, что иммунный ответ на другие, не поверхностные, антигены вируса играет значительно меньшую роль в иммунитете к вирусным инфекциям. Примером важности иммунитета к поверхностным антигенам служит мощная пандемия, вызванная в 1957 г. новым штаммом вируса гриппа А. Азиатский штамм вируса гриппа А содержал новые поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидазу); ранее человек не контактировал со штаммами, содержащими эти или родственные антигены. Вместе с тем главные внутренние белки нового вируса были близкородственны соответствующим антигенам предшествующих штаммов, с которыми большая часть индивидуумов уже сталкивалась. Несмотря на этот предшествующий опыт, азиатский вирус гриппа А быстро распространился без каких-либо очевидных иммунологических ограничений. Дополнительные доказательства важной роли поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А в иммунитете были представлены в исследованиях по переносу пассивного иммунитета на мышах. Моноклональные антитела, направленные против гемагглютинина и нейраминидазы, защищают мышей против заражения вирулентным диким типом вируса, в то время как моноклональные антитела, специфичные для внут-

¹ Brian R. Murphy, Robert M. Chanock, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20205.

ренных белков — нуклеопротеина и матричного белка, — не изменяют течения болезни [6]. Эти наблюдения указывают, что успешная стратегия иммунопрофилактики против вирусных инфекций требует формирования иммунного ответа к антигенам, присутствующим на поверхности вирионов и на зараженных клетках. Чтобы облегчить обсуждение свойств этих важных белков или гликопротеинов, мы будем называть их *защитными* антигенами. Идентификация защитных антигенов представляет важный первый шаг в создании эффективных живых или инактивированных вирусных вакцин.

Вирусы, несущие поверхностные антигены — гликопротеины, презентируют эти антигены иммунной системе двумя различными путями, а именно на поверхности вирионов или на поверхности зараженных клеток. В последние годы защитные поверхностные антигены, необходимые для иммунитета, идентифицированы у многих вирусов. Часто в формировании иммунитета к таким вирусам участвует не один, а несколько поверхностных антигенов. Антитела к поверхностным гликопротеинам gA/B, gC, gD или gE вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1) нейтрализуют инфекционность и, предположительно, обеспечивают иммунитет *in vivo* [134, 142, 155, 191]. Цитотоксические Т-клетки (Tc) также распознают эти поверхностные антигены HSV-1 [35]. Аналогичным образом участвуют в иммунитете два поверхностных гликопротеина миксовирусов и парамиксовирусов. Гемагглютинин — гликопротеин миксовирусов — необходим для прикрепления вирусов к рецепторам клетки-хозяина и для последующего слияния с внутриклеточными мембранами. Этот поверхностный антиген стимулирует образование нейтрализующих антител и служит главной мишенью для цитотоксических Т-клеток на поверхности зараженных клеток [6, 82, 86]. Нейраминадаза требуется для освобождения вируса из зараженных клеток. Антитела, направленные против нее, препятствуют выделению вируса из зараженных клеток и таким образом уменьшают количество вируса, образующегося в процессе заражения; однако антитела к нейраминидазе не нейтрализуют сколь-нибудь эффективно инфекционности вируса [6]. У птиц, животных и человека иммунитет к поверхностным гликопротеинам играет большую роль в устойчивости организма к заражению и заболеванию, причем более важна иммунная реакция на гемагглютинин и менее — реакция на нейраминидазу [6]. У вирусов парагриппа антитела к обоим гликопротеинам — гемагглютнину — нейраминидазе (HN) и к фузионному гликопротеину (F) — нейтрализуют инфекционность вируса [105, 106]. Однако только антитела к белку F предотвращают распространение инфекции путем слияния зараженных клеток с незараженными. Тем не менее пас-

сивный перенос антител как к белку HN, так и к белку F защищает мышей от заражения их вирусами парагриппа [140].

Моноклональные антитела к поверхностному гликопротеину E2 альфавируса Синдбис нейтрализуют инфекционность вируса [165]. Однако моноклональные антитела к гликопротеину E1, также присутствующему на поверхности этого вируса, не способны к такой нейтрализации. Тем не менее как нейтрализующие, так и ненейтрализующие антитела предотвращают летальные энцефалиты у мышей [165]. Нейтрализующие антитела к E1 проявляют свой защитный эффект совместно с комплексом, лизируя зараженные клетки, имеющие на поверхности антиген E1. Моноклональные антитела к единственному поверхностному гликопротеиновому антигену вируса желтой лихорадки (флавивируса) нейтрализуют инфекционность. Наконец, следует отметить, что иммунитет к вирусу гепатита В опосредуется его поверхностным гликопротеиновым антигеном [178].

Главные защитные антигены икосаэдрических вирусов также расположены на поверхности. Антитела к капсидному белку пикорнавирусов VP1, а также к белкам гексона и фибрилл у аденовирусов нейтрализуют инфекционность и обеспечивают резистентность *in vivo* [14, 24, 95, 11, 112, 196]. Главным защитным антигеном реовирусов является гемагглютинин — поверхностный белок S1 [193]. Кроме того, что он реагирует с антителами, этот белок служит также мишенью для цитотоксических Т-клеток, лизирующих зараженные Т-клетки [46]. Аналогичным образом стимулирует образование нейтрализующих антител наружный капсидный гликопротеин ротавируса gp 35 [59, 72].

Следует отметить, что развитию резистентности может содействовать иммунный ответ на некоторые внутренние белки. Например, Т-клетки, специфические к мембранному белку (М), внутреннему компоненту вируса гриппа А, помогают В-клеткам, продуцирующим антитела к вирусному гемагглютиниону, усиливая ответ на этот главный защитный антиген [160]. Не исключено, что для проявления максимальной антигенности может быть полезно включение таких хелперных антигенов в инактивированные вакцины.

Иммунные механизмы, уничтожающие вирус или зараженные им клетки

Иммунные механизмы выработались в процессе эволюции для защиты хозяина от широкого набора вирусных патогенов. Главная цель иммунного ответа — это инактивация свободного вируса и уничтожение зараженных клеток, способных выделять инфекционный вирус. За инактивацию свободного вируса

основную ответственность несет В-клеточная ветвь иммунной системы, которая осуществляет это главным образом вырабатывая нейтрализующие антитела. Кроме того, антитела, направленные против поверхностных антигенов, уменьшают инфекционность вируса, способствуя агрегации вирионов и устранению их из кровотока [64]. В каждом из этих процессов: нейтрализации, агрегации вирионов и устранении их из кровотока — антителам может помогать комплемент [27, 169]. Антитела вместе с комплементом лизируют вирусы с оболочкой и уничтожают их инфекционность [27]. Комплемент может также инактивировать некоторые вирусы с оболочкой и в отсутствие специфических антител [169].

Вирусы, созревающие на клеточной поверхности путем почкования, а также вирусы, не содержащие липидов, встраивающие свои белки в клеточную поверхность, делают зараженные клетки чувствительными к лизису, осуществляемому клеточными или гуморальными механизмами. Важнейшим среди них является индукция цитотоксических Т-клеток, распознающих антиген в комплексе с антигенами гистосовместимости класса I [34]. Показано, что у человека и животных этот механизм относится к числу важных факторов, содействующих выздоровлению [94, 150, 202]. Специфически сенсibilизированные Т-клетки при взаимодействии с клетками, зараженными вирусом, выделяют γ -интерферон, который также, вероятно, содействует выздоровлению [117]. Цитофильные антитела могут служить «оружием» лейкоцитов при осуществлении антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Установлено, что эта реакция играет важную роль в резистентности новорожденных мышей к заражению вирусом герпеса [80]. Антитела вместе с комплементом лизируют зараженные вирусом клетки; значение этого феномена становится ясным из следующего наблюдения: мыши с дефектной или истощенной системой комплемента проявляют повышенную чувствительность к некоторым экспериментальным вирусным инфекциям [63, 64].

Первоначальная резистентность к повторной инфекции обусловлена главным образом антителами, действующими на свободный вирус, так как иммунные механизмы, лизирующие зараженные вирусом клетки (а именно цитотоксические Т-клетки, АЗКЦ и антитела в комплексе с комплементом) действуют только после того, как разовьется инфекция. Однако с того момента, как инфекция начала развиваться, иммунные механизмы, направленные против зараженных клеток, играют важную роль в предотвращении заболевания или в ускорении выздоровления, ограничивая степень размножения вируса. На поздней стадии окончанию инфекционного процесса содействуют антитела, действующие на свободный вирус. Хотя отно-

сительный вклад каждого из механизмов иммунитета в резистентность точно не определен, по-видимому, для эффективной иммунопрофилактики необходима стимуляция возможно большего числа этих механизмов в правильном соотношении.

Системный иммунитет и иммунитет, опосредованный слизистой оболочкой

Патогенез вирусных болезней разнообразен; в соответствии с ним вирусы можно подразделить на три категории. Во-первых, есть вирусы, которые заражают и поражают слизистые оболочки дыхательного и желудочно-кишечного трактов. В эту категорию входят следующие: риновирусы, миксовирусы, коронавирусы, вирусы парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, ротавирусы и вирусы, подобные норуокскому агенту. Ко второй категории относятся вирусы, заражающие слизистые оболочки и размножающиеся в них, а затем распространяющиеся по кровеносным сосудам и (или) нейронам, заражая и вызывая заболевание одного или нескольких внутренних органов-мишеней или ЦНС. К вирусам этой группы относят пикорнавирусы, вирус кори, вирус паротита, HSV, вирус ветрянки и, предположительно, вирусы гепатита А и В. Третья категория включает вирусы, которые вводятся непосредственно в кровоток иглой, насекомым-переносчиком или в результате травмы. Эти вирусы затем распространяются и проникают в соответствующие органы-мишени. К вирусам этой категории принадлежат вирус гепатита В, альфавирусы, флавивирусы и бунья-вирусы.

Присутствующие в кровотоке антитела нейтрализуют инфекционность вируса и способствуют очищению от вирусов, распространяющихся с кровью. Таким способом значительно снижается или вообще предотвращается заражение органов-мишеней. Болезни, вызываемые вирусами, которые попадают в эту категорию (например, корь, полиомиелит, гепатит А, краснуха, оспа и ветрянка), можно предотвратить или смягчить профилактическим введением иммуноглобулина, часто при небольшом количестве антител, когда их уровень в крови реципиентов не регистрируется [74, 83, 103, 158]. Хотя антитела важны для ограничения распространения вирусов в организме, при многих системных инфекциях, таких как оспа, корь и герпес, в выздоровлении важную роль играют цитотоксические Т-клетки. У детей с иммунодефицитом, для которых характерны дефекты Т-клеточной системы, вирусы перечисленных выше болезней вызывают необычно тяжелое их течение.

Иммунитет, опосредованный слизистой оболочкой, который, как полагают, осуществляется главным образом при посред-

стве антител IgA, играет значительную роль в резистентности к повторной инфекции вирусами, размножающимися исключительно в слизистых оболочках, особенно выстилающих верхние дыхательные пути. Значение местных антител IgA в предотвращении заражения или в ограничении размножения вируса и развития поражений верхних дыхательных путей показано для риновирусов, вирусов парагриппа, вируса гриппа А и респираторно-синцитиального вируса при экспериментальном заражении добровольцев или животных [110, 120, 136, 137, 144, 170]. В отличие от этого сывороточные антитела, по-видимому, не защищают верхние дыхательные пути. Относительная важность местных и сывороточных антител в устойчивости к заболеваниям нижних дыхательных путей, вызываемых этими вирусами, и в выздоровлении пока не установлена. Известно, однако, что сывороточные антитела защищают нижние дыхательные пути [6]. У мышей пассивный перенос моноклональных антител к гемагглюнину или нейраминидазе вируса гриппа А предотвращает смертельную пневмонию [6]. Клеточный иммунитет также играет защитную роль, поскольку при гриппе Т-клетки способствуют выздоровлению мышей, уменьшая размножение вируса в легких [195, 202].

Ясно, что иммунитет не обеспечивается исключительно иммуноглобулинами или исключительно цитотоксическими Т-клетками. Устойчивость к заболеванию обуславливается обоими иммунными механизмами независимо от того, достигается ли это предотвращением заражения или ограничением размножения вируса. Цель иммунопрофилактики должна состоять в стимуляции обоих этих механизмов в правильном соотношении. Если требуется защита слизистых оболочек, то особые усилия должны быть направлены для достижения эффективной стимуляции местной иммунной системы. В то же время для защиты хозяина от вирусов, вызывающих болезни с системным распространением по органам-мишеням, достаточно наличия нейтрализующих антител в сыворотке и системного иммунитета.

Имеющиеся в настоящее время разрешенные вакцины

Первая примененная на людях вакцина содержала живой вирус осповакцины. Она была создана Дженнером почти 200 лет назад, и в течение последующих двух веков был накоплен опыт успешного применения вакцины для борьбы с оспой. Эта вакцина сыграла главную роль в конечном искоренении страшной болезни. Парадоксально, однако, что происхождение этого важнейшего вакцинного штамма вируса остается неясным. Попытки определить его происхождение с помощью современных методов молекулярной биологии дали не-

однозначные результаты. Вирус осповакцины не идентичен ни вирусу натуральной оспы, ни вирусу коровьей оспы [97].

С момента введения в практику осповакцины были получены разрешения на вакцины против 14 других патогенных вирусов. Некоторые из них также сыграли важную роль в борьбе с заболеваниями, против которых они направлены, — особенно с полиомиелитом, желтой лихорадкой, корью и краснухой.

Имеющиеся в обращении разрешенные инаktivированные вакцины

Инаktivированные вакцины применяют для профилактики гриппа, полиомиелита, бешенства и гепатита В у человека. Все вакцины, за исключением вакцины против гепатита В, готовят из суспензий, выращенных на куриных эмбрионах (вирус гриппа типа А и В) [7], культуре клеток почек обезьян (вирусы полиомиелита типов 1, 2 и 3) или культуре диплоидных фибробластов человека (вирус полиомиелита, вирус бешенства) и затем инаktivируют формалином. Инаktivированная вакцина из вируса полиомиелита высокоэффективна в предотвращении болезни [65], в то время как вакцина против вируса гриппа обеспечивает только частичную защиту [108].

С целью увеличения степени очистки и снижения токсичности разработана частично очищенная субъединичная вакцина против вируса гриппа. Она содержит поверхностные антигены вируса (гемагглютинин и нейраминидазу) и менее токсична, чем инаktivированная вакцина из целого вируса. Но эффективность защиты при использовании таких вакцин не повышается [143, 146]. Более того, у ранее неиммунизированных индивидумов субъединичная вакцина из вируса гриппа, по-видимому, имеет меньшую антигенную активность, чем инаktivированная цельновирусная вакцина [9, 10, 143].

Наконец, самая последняя из разработанных инаktivированных вакцин — это высокоочищенный субъединичный препарат, содержащий поверхностный антиген (22 нм) вируса гепатита В [84, 178]. Эта вакцина, предназначенная для защиты от гепатита В, необычна, так как поверхностный антиген выделяют из крови хронически зараженных носителей. Хотя вакцина, приготовленная таким образом, эффективна в предупреждении гепатита В, она, по-видимому, не найдет широкого применения, так как очень дорога из-за сложной процедуры очистки и длительной проверки на безопасность. Остается только сожалеть об этом, поскольку значительная часть населения, нуждающегося в иммунизации данной вакциной, живет в развивающихся странах.

Потенциальные источники антигенов для будущих инактивированных вакцин

Недавние достижения в области молекулярной биологии и синтеза пептидов создают основу для производства фактически неограниченных количеств очищенных вирусных белков или синтетических пептидов для использования их в иммунопрофилактике. Доступность больших количеств антигена делает возможным местное применение антигена для иммунизации против инфекций слизистых оболочек. В настоящее время при получении очищенных вирусных антигенов используют два различных подхода. Первый включает производство синтетических пептидов, соответствующих иммунологически важным доменам поверхностных антигенов [4], а второй — использование встроенной в соответствующий вектор клонированной вирусной ДНК для производства вирусных белков в эукариотических и прокариотических клетках.

Синтетические пептиды

Использование синтетических пептидов в качестве иммуногенов впервые предложено Лангбехеймом, Арноном и Села, которые изучали синтетический икосапептид, представляющий собой иммунодоминантный участок наружного белка оболочки бактериофага MS2 [88]. Первоначально был идентифицирован и секвенирован реагирующий с нейтрализующими антителами цианогенбромидный фрагмент белка оболочки. Затем этот икосапептид был синтезирован и конъюгирован с синтетическим носителем, поли-DL-аланином, в результате чего образовался иммуноген, стимулирующий при введении с полным адьювантом Фрейнда формирование антител у кроликов. Инкубация этих антител с фагом с последующим добавлением антикродельевого иммуноглобулина приводила к нейтрализации инфекционности фага.

Быстрый прогресс в определении последовательностей РНК или ДНК различных вирусных генов упростил отбор пептидов с потенциальной антигенной активностью. В течение последних нескольких лет идентифицированы главные антигенные детерминанты защитных белков ряда важных патогенных вирусов. Это достигнуто с помощью комбинации различных методов: а) определения трехмерных структур антигена (гемагглютина и нейраминидазы вируса гриппа А); б) сравнения аминокислотных последовательностей вирусных антигенов, подвергающихся естественным антигенным изменениям [гемагглютина и нейраминидазы вируса гриппа и VP1 вируса ящура (FMDV)]; в) анализа последовательностей компонентов вирусных мутантов, отобранных по способности противостоять дей-

ствию моноклональных антител, нейтрализующих инфекционность вируса [вируса гриппа (гемагглютинин и нейраминидаза) и вирусов полиомиелита типов 1 и 3 (VP1)]; г) идентификации высокогидрофильных участков, которые занимают на молекуле белка наружные доступные зоны [25, 90, 112, 159, 197]. Быстрое накопление указанной информации стимулировало значительный интерес к производству синтетических пептидов, представляющих собой основные антигенные участки нескольких важных патогенных вирусов, и к оценке иммуногенности этих пептидов.

Очевидно, небольшие пептиды существуют в состоянии равновесия всех возможных конформаций. К этим конформациям относятся и соответствующие тем, которые присутствуют на поверхности вируса. Благодаря этому они стимулируют формирование антител, реагирующих с поверхностными белками интактного вируса. Возможность использования синтетических пептидов для индукции резистентности организма недавно показана для вируса ящура. Икосапептид, соответствующий главной антигенной детерминанте VP1 FMDV, был химически связан с носителем, гемоцианином моллюска фисурелла (KLH), а затем введен морским свинкам с адъювантом Фрейнда. Иммунизированные животные оказались резистентными к заражению FMDV дикого типа [14].

После первоначального успешного получения иммуногенных пептидов FMDV возникли надежды, что с пептидами других вирусов успех будет столь же быстрым. Однако этого не случилось; результаты опытов оказались разнородными: были успешные, были и неудачные. Например, пептиды многих гидрофильных участков гемагглютинина вируса гриппа, включая главные антигенные детерминанты, стимулировали образование антител, которые связывались с гемагглютинином, но эти антитела не нейтрализовали вирусную инфекционность и не обеспечивали статистически значимой защиты от заражения в опытах на хомячках [58; Мэрфи, неопубликованные данные]. Аналогичные исследования на мышах выявили только частичную защиту [5]. Однако пептид HBsAg, содержащий групповые и подгрупповые детерминанты, несмотря на низкий уровень антител, индуцируемых им у шимпанзе, полностью защитил одно животное из трех от заражения вирусом гепатита В и придал частичную устойчивость другому [54]. Кроме того, пептиды, состоящие из 16 и 23 аминокислот и соответствующие 3'-концевым участкам генома HSV-1, вызвали значительную устойчивость у мышей к заражению их летальной дозой HSV-2 [32].

После успеха с FMDV были получены неожиданные результаты: пептиды, соответствующие главным антигенным детер-

минантам VP1 вируса полиомиелита типа 1 почти или совсем не стимулировали образования нейтрализующих антител. Однако у животных, которым эти пептиды были введены, в ответ на последующее введение субиммунизирующих количеств целого вируса наблюдался высокий уровень нейтрализующих антител [39]. Этот эффект праймирования может в конечном счете оказаться одним из наиболее важных достижений иммунопрофилактики. Например, пептидный праймер может превращать умеренный иммунный ответ, обычно наблюдающийся после введения аттенуированной вирусной вакцины, в выраженный ответ с высоким уровнем антител, сходный с тем, который индуцируется вирулентным вирусом.

Хотя подход с использованием синтетических пептидов обладает значительными потенциальными возможностями, остается неразрешенным ряд реальных или теоретических препятствий. Слабая антигенная активность большинства синтетических пептидов вынуждает для усиления иммунного ответа использовать в экспериментальных исследованиях на животных адъювант Фрейнда. В связи с тем что на людях адъювант Фрейнда использовать нельзя, для клинического применения синтетических пептидов необходимо обнаружение или разработка эффективных адъювантов, пригодных для человека. Не исключено, что одного пептида будет недостаточно для индукции резистентности, так как большие поверхностные антигены обычно содержат несколько различных иммунологических доменов, вызывающих защитный гуморальный и (или) клеточный ответ [15, 197]. Иногда идентификация небольших защищающих пептидов может оказаться невозможной, как, например, пептидов гемагглютинина вируса гриппа А, которые стимулировали бы образование антител, эффективно нейтрализующих инфекционность вируса [58, 70, 119]. Можно также предсказать трудности в стимуляции иммунного ответа к эпитопам, которые сформированы в результате сближения разных участков линейной белковой молекулы. Наконец, ожидаемому антительному ответу у значительной части населения может препятствовать полиморфизм антигенов гистосовместимости класса II, контролирующих ответ на синтетические антигены [168]. Однако, поскольку уже достигнута защита на одной экспериментальной модели, можно надеяться на получение иммунотенных препаратов, активных в отношении других вирусов.

Очищенные вирусные белки, получаемые с помощью клонированных вирусных ДНК

В настоящее время гены РНК- или ДНК-содержащих вирусов легко клонируются в клетках прокариот при использовании плазмидного или фагового вектора. Клонированная вирус-

ная ДНК может быть экспрессирована в виде вирусного белка в прокариотических или эукариотических клетках. Например, капсидный белок вируса ящура (FMDV) VP1, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBV), гемагглютинин вируса гриппа А, поверхностный гликопротеин вируса бешенства и белок gD вируса герпеса были синтезированы в бактериальных клетках [37, 40, 61, 79, 85, 191, 203]. В каждом отдельном случае клонированную ДНК вируса встраивали в плазмиду за сильным конститутивным или индуцируемым бактериальным промотором, а также участком связывания с рибосомами, что гарантировало эффективную экспрессию. При встраивании вирусных ДНК-последовательностей по ходу транскрипции за последовательностью, соответствующей аминоконцевой части белка, который кодирует бактериальный ген, контролируемый таким промотором, увеличивается экспрессия и облегчается очистка вирусного антигена в форме нерастворимого рекомбинантного бактериально-вирусного белка. При использовании этого подхода доля белка VP1 FMDV, эффективно синтезируемого в *E. coli*, составляет 17 % общего белка, образующегося в трансформированных бактериальных клетках [79]. При смешивании с неполным адьювантом Фрейнда этот белок вызывает резистентность к заражению диким типом FMDV у крупного рогатого скота и свиней.

Гликопротеин gD вируса простого герпеса также эффективно синтезируется в *E. coli* в виде негликозилированного рекомбинантного белка, который стимулирует образование нейтрализующих антител у кроликов [194]. Указанные результаты свидетельствуют о том, что гликозилирование поверхностного гликопротеина вируса не является необходимым условием антигенности и способности вызывать образование нейтрализующих антител. Негликозилированный белок гемагглютинина вируса гриппа А, который был экспрессирован как химерный бактериально-вирусный белок в *E. coli*, также индуцировал иммунный ответ у мышей и кроликов [31]; однако образующиеся при этом антитела не угнетали гемагглютинацию и не нейтрализовали инфекционности вируса [129].

Генноинженерными методами можно также создать плазмидные векторы для экспрессии вирусных белков, не слитых с бактериальными, например поверхностного гликопротеина вируса бешенства [99, 203]. Хотя синтезированный таким способом гликопротеин вируса бешенства имеет полную длину, он не гликозилирован и не вызывает защитного иммунитета у мышей [99]. Как уже отмечалось выше, неполный адьювант Фрейнда, используемый для обнаружения антигенности синтезированных в *E. coli* вирусных белков, не годится для применения на людях. Это означает, что, прежде чем эти белки

можно будет применять для иммунизации человека, необходимо разработать эффективный адъювант, пригодный для применения на людях.

Для HBV разработано несколько методов получения поверхностного антигена в клетках эукариот. Стимулом для этих разработок послужила острая необходимость в дешевой вакцине. Хотя имеющаяся в настоящее время разрешенная вакцина против HBV, содержащая (22 нм)-поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), который получен из плазмы хронически инфицированных носителей, защищает от заболевания, высокая стоимость препятствует ее использованию в развивающихся странах, где нужда в эффективной иммунопрофилактике особенно велика. Возможно, эта ситуация скоро будет исправлена, поскольку в настоящее время антиген HBsAg получают из дрожжей в количествах, очевидно, достаточных для его поступления в продажу. Его экспрессия достигается при трансфекции дрожжей рекомбинантом, который содержит ген поверхностного антигена HBV, встроенный в плазмиду за индуцируемым промотором [113, 186]. Продуцируемый дрожжами HBsAg, очевидно, не гликозилирован, но иммуногенен в организме шимпанзе. После разрушения дрожжевых клеток антиген очищают с помощью изопикнического и скоростного зонального центрифугирования в комбинации с иммуоаффинной хроматографией [16, 186, 189].

Для использования в качестве вакцины антиген HBsAg можно также получать в клетках млекопитающих. Например, при трансфекции геном поверхностного антигена HBV, связанным с *tk*-геном HSV, мышинных клеток L, дефектных по тимидинкиназе (*tk*), образуются частицы размером 20—25 нм со специфичностью HBV [147]. Эти частицы структурно и антигенно сходны с частицами, выделенными из плазмы хронически зараженных лиц, которая является источником антигена для вакцины, разрешенной в настоящее время к употреблению. Если бы эффективность экспрессии можно было увеличить, то секретирующие поверхностный антиген клетки, трансформированные HBV, могли бы служить источником непрерывной продукции неинфекционного антигена для вакцины.

HBsAg продуцируется также а) клетками *coc* (обезьянья клеточная линия, стабильно трансформированная интегрированным SV40, имеющим дефектную область начала репликации), зараженными рекомбинантом SV40—HBsAg, и б) перевиваемой линией мышинных клеток, трансформированных рекомбинантом вируса бычьей папилломы и HBsAg (BPV—HBsAg) [16, 109, 176]. Клиническая оценка антигенов, полученных таким образом, станет возможной после разрешения использования перевиваемых клеточных линий и рекомбинантных векто-

ров, несущих фрагменты геномов трансформирующих вирусов. Вероятно, первым будет разрешено использование вакцины против HBV, получаемой с помощью дрожжей.

В клетках млекопитающих были экспрессированы также другие иммуногенные защитные антигены вирусов. При этом использовали рекомбинантные векторы, содержащие один или несколько промоторов эукариот и добавочный ген, например ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР), облегчающей селекцию трансформированных клеток. Поверхностный защитный антиген HSV-1, gD, был экспрессирован в перевиваемой линии клеток яичников китайских хомячков (СНО), дефектных по ДГФР, при использовании челночного вектора, который содержит плазмидные последовательности, участок начала репликации SV40 и ген ДГФР, используемый для отбора трансформированных клеток. СООН-концевой трансмембранный участок белка gD был deletирован, что позволило экспрессированному гликопротеину секретироваться в культуральную среду. Этот продукт стимулировал формирование нейтрализующих антител и защищал мышей от летального заражения HSV-1 [89]. В клетках СНО, дефектных по ДГФР, при использовании указанного вектора экспрессировались также значительные количества поверхностного антигена HBV. В дальнейшем благодаря появлению доступных и чрезвычайно чувствительных методов, необходимых для определения освобождения конечного очищенного антигена от клеточной и вирусной ДНК, можно будет использовать для производства вакцин перевиваемые клеточные линии, такие как клетки СНО, и рекомбинантные векторы, несущие фрагменты генома трансформирующих вирусов.

Преимущества инактивированных вакцин

Инактивированные вакцины имеют определенные преимущества, поскольку при иммунизации ими риск заражения почти или даже совсем отсутствует. Такие вакцины не должны содержать вирус в неинактивированной форме или в виде примеси, поскольку случайное присутствие неинактивированного вируса может иметь серьезные последствия. И подобные примеры известны. Так, ранние не полностью инактивированные партии полиомиелитной вакцины индуцировали паралитические заболевания [128, 145]. Эта проблема была очень быстро решена, когда ввели более строгие методы определения остаточной инфекционности и изменили технологию производства вакцины, которая стала гарантировать получение монодисперсной суспензии вируса. В некоторых ранних сериях инактивированного вируса полиомиелита была обнаружена примесь

постороннего инфекционного агента. Это вызвало некоторое беспокойство, так как им оказался онкогенный обезьяний вирус SV40 [68]. К счастью, долгосрочные наблюдения за лицами, получившими вакцину с примесью этого вируса парентерально в младенческом или детском возрасте, не выявили ее онкогенного действия [118]. Использование очищенных вирусных белков или синтетических пептидов должно способствовать устранению загрязнений обоих типов. Кроме того, возможность долгосрочных отрицательных эффектов, связанных с заражением или интеграцией с геномом хозяина вирусной нуклеиновой кислоты, устраняется при приготовлении вакцин, свободных от нуклеиновых кислот.

Недостатки инаktivированных вакцин

Иногда инаktivированные вакцины вместо того чтобы предотвращать заболевание, усиливают его [50, 73]. Впервые это было отмечено для инаktivированной формалином вакцины против вируса кори [50]. Первоначально эта вакцина предотвращала корь, но через несколько лет вакцинированные теряли устойчивость к этому заболеванию. При заражении вирусом кори у вакцинированных развивалась атипичная картина заболевания с выраженными системными симптомами и пневмонией [50, 125, 154]. Ретроспективный анализ показал, что формалин, использованный для инаktivации, разрушал антигенные свойства коревого белка F, но не изменял белка H (гемагглютинирующий белок, обеспечивающий прикрепление к клеткам) [131, 132]. Таким образом, у вакцинированных возникала несбалансированная иммунная реакция, при которой развивался иммунный ответ на белок H, но не на белок F. Позднее было показано, что вакцинированные отвечали на парентеральное введение живого аттенуированного вакцинного вируса развитием в месте его введения реакции Артюса [17]. Это позволило предположить, что у вакцинированных в ответ на заражение диким типом вируса кори развивался ускоренный иммунный ответ на белок H, что создавало условия для реакции H-антиген — антитело с присущими ей иммунопатологическими последствиями. Формалин по-разному действовал также на поверхностные гликопротеины вирусов паротита и паргриппа; антиген F разрушался, в то время как антигенные свойства гемагглютинина — нейраминидазы (HN) сохранялись [133, 140].

Усиление симптомов болезни было отмечено также после введения инаktivированной формалином вакцины из вируса RS [23, 51, 73]. В этой ситуации может играть роль несбалансированный ответ на поверхностные гликопротеины вирусов, напри-

мер белок F или белок, обеспечивающий прикрепление к клеткам. Не исключено, что при этом имеет большое значение дисбаланс в ответе, когда системный иммунитет превалирует над местным. Следует отметить, что парадоксальный эффект такого типа не наблюдался с инактивированными гриппозными вакцинами, хотя процесс очистки вируса и инактивации его формалином ведет к преимущественной инактивации антигенных свойств нейраминидазы [75]. По-видимому, целью иммунизации инактивированными вакцинами или очищенными вирусными антигенами должно быть достижение сбалансированного иммунного ответа, направленного против защитных антигенов. Этот ответ должен иметь сходство с тем, который индуцируется при естественном заражении. Если это не достигается, несбалансированный иммунный ответ, индуцированный парентеральной иммунизацией, может приводить к усилению болезни, вызываемой вирусом дикого типа.

Парентеральная иммунизация против инфекций, поражающих слизистые, может быть недостаточно эффективной в связи с тем, что инактивированный антиген не в состоянии стимулировать удовлетворительный местный иммунный ответ. Часто при парентеральной иммунизации местный иммунный ответ стимулируется менее эффективно, чем системный [12, 53, 100, 138, 139, 144]. Это означает, что в данном случае резистентность верхних дыхательных путей может быть менее полной, чем та, которая обусловлена местной иммунизацией или инфекцией. Более того, в случае вируса гриппа иммунный ответ, индуцированный парентеральным введением, менее продолжителен и менее широк, чем иммунный ответ, стимулируемый заболеванием [146, 188]. Можно, однако, вызвать эффективный местный ответ путем введения больших количеств инактивированного антигена, продуцированного *in vitro* с помощью метода рекомбинантной ДНК. В этой ситуации экономические ограничения несущественны, так как можно получать практически неограниченные количества антигена. Иногда это необходимо, потому что при удалении с поверхности вирионов антигены вируса обычно в значительной степени теряют антигенные свойства.

Инактивированные вакцины могут также уступать живым аттенуированным вирусным вакцинам в отношении Тс-ответа, играющего важную роль в выздоровлении и в развитии резистентности к болезням, вызываемым широким набором вирусов. Ответ этого типа наиболее эффективно индуцируется антигенами, которые презентуются в ассоциации с клеточными поверхностными антигенами гистосовместимости [2, 192]. Неудивительно поэтому, что инактивированный вирус гриппа значительно менее эффективен в стимуляции первичного Тс-ответа

у мышей, чем инфекционный вирус [192]. В противоположность этому эффективный вторичный Тс-ответ у сенсibilизированных мышей или людей стимулируется инактивированным вирусом гриппа или полученными из него очищенными поверхностными гликопротеинами [2, 41, 42, 192]. Первичный Тс-ответ человека на инактивированные антигены вируса гриппа до настоящего времени не изучен. Тем не менее данные, полученные в исследованиях на животных, позволяют предположить, что слабый первичный Тс-ответ может ограничивать эффективность инактивированной вакцины, приготовленной из вирусов с оболочкой.

Вместе с тем инактивированный вирус гриппа активно индуцирует Т-клетки, которые участвуют в реакции гиперчувствительности замедленного типа Тd [2, 92]. Тd-клетки, относящиеся к клеткам, рестриктированным по антигенам гистосовместимости класса II, усиливают у мышей пневмонию, вызванную вирусом гриппа [18, 91]. Адоптивный перенос Тd-клеток мышам, зараженным вирусом гриппа, усиливает легочную инфильтрацию и смертность [2, 91], однако уровень репликации вируса в организме этих мышей не снижается. Эти данные противоположны результатам, полученным с Тс-клетками, относящимися к рестриктированным по антигенам гистосовместимости класса I: Т-клетки участвуют в процессе очищения легких зараженных мышей от вируса и снижают клеточную инфильтрацию [94, 195, 202]. Недавно было выдвинуто предположение, что в усилении заболевания, вызываемого коревой и RS-вакциной, играет роль избирательная индукция клеток Тd этими инактивированными вакцинами [1]. Данную точку зрения подтверждают предварительные исследования, в которых было показано, что инактивированные вакцины против кори и RS-вируса индуцируют у мышей реакцию гиперчувствительности замедленного типа [1].

Единственная инактивированная вирусная вакцина, которая рекомендована к ежегодному введению, по прошествии нескольких лет, по-видимому, утрачивает свою эффективность. Это заметили при ежегодном (в течение четырех лет) введении рекомендованной в настоящее время инактивированной гриппозной вакцины группе школьников, которых держали под наблюдением с целью определения уровня заболеваемости вирусом гриппа А [69]. Кумулятивная заболеваемость гриппом в этой группе не отличалась от заболеваемости у непривитых детей, несмотря на то что в течение первого года вакцина оказывала защитное действие. Причины потери эффективности вакцины неизвестны.

В период 1976—1977 гг. при широком использовании инактивированной вакцины, приготовленной из вируса гриппа А

(HINI) («свиного»), наблюдался синдром Гильен-Барре [166]. Это указывает на то, что инактивированная вакцина может индуцировать непредвиденный, не сразу проявляющийся, неблагоприятный побочный эффект. Удивительно, что этот синдром не наблюдали при применении последующих инактивированных противогриппозных вакцин, хотя они были приготовлены таким же способом, что и вакцина в 1976 г. [167].

Живые вирусные вакцины

Живые вирусные вакцины, применяемые в настоящее время

В отличие от вируса осповакцины каждый из вирусов, разрешенных для использования в качестве живых вакцин, имеет четкую родословную. Во всех случаях штаммы происходят от вирусов человека. Аденовирусные вакцинные штаммы (типы 4 и 7) представляют собой дикие типы вирусов человека, вызывающие бессимптомную инфекцию благодаря способу их введения и ограничению репликации в месте введения, где болезнь не развивается [19]. Одним из наиболее широко используемых вакцинных штаммов является встречающийся в природе аттенуированный вирус полиомиелита, который был идентифицирован по отсутствию вирулентности при его введении в головной и спинной мозг обезьян (вирус полиомиелита тип 2, штамм 712) [169]. Остальные вакцинные вирусы получены серийными пассажами на неприродном хозяине, ведущими к появлению мутантов, размножение которых в организме человека частично ограничено в месте введения и(или) в органе-мишени. Аттенуированные таким образом мутанты вируса краснухи или вирусов полиомиелита типа 1 и 3 отобраны путем пассирования в культуре клеток почек обезьян [43, 163]. Вакцинные штаммы вируса желтой лихорадки (штамм 17D) и вируса кори получены в культуре клеток куриного эмбриона, в то время как для аттенуации вируса паротита использовали сами куриные эмбрионы [43].

При работе с вирусами желтой лихорадки и полиомиелита перспективные вакцинные штаммы идентифицировали по их аттенуации для экспериментальных животных. Штамм 17D вируса желтой лихорадки обладает пониженным сродством к печени обезьян, и это указывает на то, что мутант может оказаться в нужной степени аттенуированным для человека [182]. Это предположение было подтверждено во время последующих клинических испытаний. Аналогичным образом при введении в спинной мозг обезьянам была определена нейровирулентность

встречающихся в природе и пассированных в культуре ткани штаммов вируса полиомиелита [161, 163]. Эту систему выбрали потому, что у обезьян клетки спинного мозга более перmissive в отношении нейролитического действия вируса полиомиелита, чем у человека [161, 163]. Сначала определили наименее вирулентные для обезьян штаммы, а затем их клонировали и реклонировали методом бляшек, чтобы получить потомство с возможно более низким уровнем нейровирулентности. Полученные вирусы проверяли в клинических испытаниях, где была показана их удовлетворительная аттенуация и иммуногенность.

Для других вакцинных вирусов экспериментальная система оценки вирулентности была недоступна. Поэтому их испытывали на аттенуацию непосредственно на людях. Сначала препараты вакцин против кори и краснухи не были достаточно аттенуированы, но дальнейшие пассажи вируса краснухи в культуре клеток почек обезьян и селекция холодоадаптированных температурочувствительных мутантов вируса кори дали удовлетворительные вакцинные штаммы. Аттенуацию вируса паротита также проверяли на людях.

Полиовирусную и аденовирусную вакцины вводят перорально, в то время как вакцины против желтой лихорадки, кори, краснухи и паротита вводят парентерально. Применяемые в настоящее время способы введения, по-видимому, оптимальны во всех случаях, за исключением вакцины против кори, которая нейтрализуется сывороточными антителами, поступающими через плаценту. Поскольку этот ингибирующий эффект сохраняется до 15 мес жизни, в США коревая вакцина не рекомендуется для введения детям в возрасте моложе 15 мес. Правда, в США проблемы кори практически нет, так как она здесь почти полностью ликвидирована. В развивающихся странах ситуация другая — там коревая инфекция встречается в раннем возрасте и оказывает опустошающее действие среди детей с недостаточным питанием. Можно попытаться решить эту проблему аэрозольным введением коревой вакцины. Недавние исследования показали, что 100 % младенцев в возрасте 4—6 мес, имеющих материнские антитела в сыворотке, удалось инфицировать, вводя вакцинный вирус в легкие в виде мелкодисперсного аэрозоля [162]. Материнские антитела, присутствующие до вакцинации в титре 1:25—1:512 (определяемом по подавлению бляшкообразования), не предотвращали иммунного ответа, хотя при введении вакцины подкожным путем при таких же титрах антител иммунный ответ предотвращался.

Следует отметить, что, за исключением аденовирусной вакцины, каждая из разрешенных в настоящее время живых вирусных вакцин, направлена против вируса со сложным патогенезом инфекции, при котором вирус попадает в организм

парентерально (желтая лихорадка) или путем внедрения в поверхностный слой слизистой (корь, паротит, краснуха и полиомиелит), а затем распространяется по организму к одному или нескольким органам-мишеням.

Основы аттенуации

Мутанты, отобранные пассажами на неприродном хозяине, накапливают много мутаций, затрудняющих точное определение генетических основ их аттенуации. Для употребляемых в настоящее время живых вакцин этот вопрос пока плохо разработан. Удовлетворительно аттенуированные мутанты являются продуктами процесса «генетической рулетки» и последующей селекции мутантов, обладающих нужными свойствами аттенуации и иммуногенности. Это подтверждает неудачная попытка Тейлера с соавт. [181] получить новые аттенуированные мутанты вируса желтой лихорадки с помощью процедуры, которая уже дала удовлетворительно аттенуированный штамм 17D.

Применяя довольно простые методы *in vitro*, некоторые вакцинные вирусы можно отличить от диких родительских штаммов. Например, репликация вакцинных штаммов вируса полиомиелита чувствительна к температуре, а репликация родительских нечувствительна [126]. Другой пример — вакцинный вирус краснухи, который можно отличить от его родителей по антигенным свойствам [93]. Вакцинные штаммы вирусов полиомиелита типа 1 и 3 можно также отличить от родительских вирусов, испытывая их *in vivo* на нейровирулентность [161]. При введении в высоком титре непосредственно в спинной мозг вакцинный вирус не парализует обезьян, в то время как родительский штамм нейровирулентен при таком введении [162].

До настоящего времени в вирусном геноме не было картировано ни одно из свойств, позволяющих отличать вакцинные вирусы от их родительских штаммов. Более того, роль этих свойств в формировании аттенуации вирусов для человека достоверно еще не установлена. Лучше всего это можно было бы сделать с маркером нейровирулентности вируса для обезьян, но сложность происходящих в геномах этих вирусов изменений мешает приписать исключительную ответственность за аттенуацию этому свойству.

Трудность отделения мутаций, ответственных за аттенуацию, от молчащих мутаций привлекла к себе внимание при исследовании вакцинного штамма вируса полиомиелита типа 1 [77]. Анализ нуклеотидных последовательностей родительского вируса и его вакцинного варианта показал, что последний претерпел замену 57 нуклеотидов, которая в свою очередь привела к замене 21 аминокислоты [78, 130, 151]; 33 % этих замен осно-

ваний произошли в гене капсидного белка VP1, составляющем только 12 % вирусного генома. Скопление мутаций в этом капсидном белке позволяет считать, что аттенуация возникает в результате изменений его поверхностных свойств. Свой вклад в потерю вирулентности для человека могут вносить также мутации в других вирусных генах. В настоящее время этот вопрос еще не решен, но существует ряд фактов, подтверждающих, что капсидный белок VP1 является главным объектом аттенуации вакцинного штамма вируса полиомиелита типа 1.

Капсидный белок VP1 экспонирован на поверхности вириона, т. е. области, которая, как считают для других вирусов, детерминирует тканевое сродство [13, 28]. Вероятно, VP1 участвует в адсорбции вируса на клетке в культуре ткани, так как антитела к этому белку эффективно нейтрализуют инфекционность *in vitro* [24]. Адсорбция вакцинного вируса в тканях, не относящихся к нервной системе, по-видимому, не повреждена, так как в кишечнике вирус размножается до высоких титров и в течение длительного периода. Это наводит на мысль, что при изменении VP1 вакцинного штамма нарушается главным образом адсорбция на клетках органа-мишени, а именно ЦНС.

Мутации, ответственные за аттенуацию вакцинного штамма вируса полиомиелита типа 3, не концентрируются в области, детерминирующей VP1, так как последовательности этого белка у родительского и вакцинного вирусов различаются лишь одной 274-й аминокислотой [3]. Полагают, что эта замена лизина на аргинин не имеет существенного структурного значения [3]. Более того, эта замена расположена на некотором расстоянии от скопления замен, встречающихся в VP1 вируса полиомиелита типа 1. Таким образом, основа аттенуации вакцинного вируса полиомиелита типа 3 может быть иной, чем у вакцинного штамма этого вируса типа 1. Поскольку во время заражения аттенуированными вакцинными штаммами вирусов полиомиелита может наблюдаться виремия, вероятно, аттенуация этих вирусов для человека основана на ограничении их репликации в нейронах [66, 67, 104].

Вакцинный штамм вируса желтой лихорадки (17D) также подвергается мутациям, которые влияют на его защитный антиген — поверхностный гликопротеин V3 [164]. Гликопротеин V3 штамма 17D по своей электрофоретической подвижности в геле отличается от соответствующего белка родительского вируса. Более того, моноклональное антитело, распознающее гликопротеин V3 штамма 17D, не реагирует с гликопротеином V3 родительского вируса. Все эти данные указывают на то, что эти два вируса различаются по одному из эпитопов вирусного поверхностного защитного антигена. Геном вакцинного штамма 17D отличается от генома родительского вируса желтой лихорадки

по четырем большим олигонуклеотидам, т. е. изменения в вакцинном вирусе составляют только 1 % [115].

Встречающиеся в природе мутанты реовируса с измененной тропностью к ЦНС могут быть выделены экспериментально путем отбора вируса с измененным капсидным белком S1 — аналогом VP1 вируса полиомиелита [175]. S1 участвует в адсорбции вируса на клетках хозяина и представляет собой главную мишень для нейтрализующих антител [45, 193]. Мутанты реовируса, которые резистентны к действию нейтрализующих моноклональных антител, направленных против S1, обладают пониженной тропностью к специфическим участкам мозга экспериментально зараженных мышей [174]. Однако эти мутанты с измененным белком S1 нормально размножаются во внутренних органах мышей. Отобранные с помощью моноклональных антител мутации поверхностного гликопротеина вируса бешенства также могут приводить к аттенуации вируса для ЦНС [29, 33, 47], причем у мутантов возможны реверсии к вирулентности, свойственной дикому типу вируса [47]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что вирус со сложным патогенозом, включающим в себя репликацию в месте проникновения и последующее распространение, может быть аттенуирован избирательным изменением сродства к органу-мишени. Неизвестно, является ли этот механизм главным или вообще единственным для аттенуации живых вирусных вакцин, используемых в настоящее время. Следует подчеркнуть, что к аттенуации ведет ограничение любой существенной функции вируса. Таким образом, мутация, которая снижает вирулентность, может возникнуть почти в каждом гене.

Иной подход был применен для разработки живых аденовирусных вакцин, разрешенных в настоящее время для применения в армии, где аденовирус вызывает эпидемии заболевания дыхательных путей [19, 38]. В данном случае аттенуации достигают ограничением инфекции зоной организма, в которой болезнь не развивается. Вакцина содержит вирус дикого типа; ее вводят перорально в таблетках с покрытием. Когда таблетка достигает кишечника, вирус освобождается. Здесь развивается бессимптомная, вызывающая иммунитет инфекция, которая не распространяется на дыхательные пути — область развития болезни при естественном заражении. Хотя вирус выделяется с фекалиями, частота его передачи чувствительным контактирующим лицам очень низка. Избирательное инфицирование кишечника стимулирует энергичный системный иммунный ответ, который обеспечивает полную или почти полную устойчивость к аденовирусным заболеваниям [38]. Устойчивость к повторному заражению не полная, но также очень высока (70 %) [38, 73].

Преимущества живых вирусных вакцин

Основным преимуществом живых вирусных вакцин является то, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный ответ: системный и местный, причем каждый из них состоит из иммуноглобулинового и клеточного ответов. Это особенно важно для инфекций, при которых важную роль играет клеточный иммунитет, а также для инфекций слизистых оболочек, при которых для оптимальной устойчивости необходим как местный, так и системный иммунитет. Местное инфицирование живой вирусной вакциной у непримированного хозяина обычно более эффективно стимулирует местный ответ, чем парентеральное введение инактивированной вакцины [12, 100, 136—139]. Живые вирусные вакцины стимулируют иммунный ответ на каждый из защитных антигенов, и это устраняет трудности, возникающие в связи с избирательным разрушением одного из защитных антигенов, которое может произойти в процессе приготовления инактивированной вакцины.

Более того, иммунитет, индуцируемый живой вирусной вакциной, обычно более продолжителен, более эффективен и дает больше перекрестных реакций, чем иммунитет, индуцируемый инактивированной вакциной [187, 192, 199; Clements, Betts, Maassab, Murphy, неопубликованные данные]. Последнее свойство особенно важно для таких вирусов, как вирус гриппа, которые подвергаются прогрессирующим антигенным вариациям. Следует также отметить практические преимущества многих живых вирусных вакцин, к которым относятся низкая стоимость их производства и легкость введения.

Недостатки живых вирусных вакцин

Всегда существует вероятность присутствия в вакцинах случайных живых агентов. К счастью, это редко становится проблемой. Некоторые ранние серии живой полиовирусной вакцины были контаминированы живым вирусом SV40, но этот вирус быстро удалили, и все последующие серии вакцины были свободны от него [68]. Живая вакцина против желтой лихорадки сначала содержала вирус лейкоза птиц, но впоследствии ее удалось очистить от этого агента [161]. В длительных наблюдениях за индивидуумами, которые получили живую вакцину, контаминированную вирусом SV40 или вирусом птичьего лейкоза, не было обнаружено каких-либо отрицательных долгосрочных эффектов, связанных с этими посторонними вирусами, например заболеваний раком [118, 190]. Тем не менее благоразумие требует, чтобы живые вирусные вакцины были свободны от подоб-

ных загрязнений. Некоторые живые вирусные вакцины, такие как вакцинные варианты вирусов кори, краснухи и желтой лихорадки, сохраняют низкий уровень остаточной вирулентности. Реакции, вызываемые такими вакцинами, незначительны, и поэтому эти препараты широко используются. Наиболее серьезная проблема заключается в восстановлении вирулентности в ходе инфекции, вызванной вакцинными вирусами. Для полиовирусной вакцины это наблюдается чрезвычайно редко: ~ 1 случай на 10^6 — 10^7 иммунизаций [127]. Значительная часть паралитических заболеваний, связанных с вакцинным вирусом, наблюдается у лиц с дефектной иммунной системой, и это может быть не связано с проявлением генетических изменений вакцинного вируса [116]. В ряде случаев вакцинный вирус вновь приобретает вирулентность и вызывает заболевание у вакцинированного или у близко контактировавших с ним [76].

Генетическая основа очень редкого увеличения вирулентности вакцинных штаммов вируса полиомиелита во время его репликации *in vivo* неизвестна [204]. В случае вируса типа 3 в кишечнике вакцинированных может наблюдаться сдвиг в сторону более высокого уровня вирулентности для ЦНС обезьян, однако пока значение таких изменений не выяснено. Они широко распространены, но связанный с вакцинацией паралич встречается чрезвычайно редко [116, 198]. Информация о мутациях, развивающихся во время репликации вакцинного вируса в организме индивидуума с бессимптомной инфекцией или параличом, скудна. Было проанализировано пять изолятов — четыре от больных с параличом, связанным с вакцинацией (два вирусом полиомиелита типа 1 и два типа 3), и один от вакцинированного, у которого полиомиелит (типа 1) не развился. Карты больших олигонуклеотидов этих изолятов (представляющих 10 % вирусного генома) сравнивали с соответствующими картами родительских вакцинных штаммов [135]. На основании этих исследований было установлено, что четыре изолята из пяти обследованных (три типа 1 и один типа 3) претерпели от 40 до 70 мутаций [135]. Картина мутаций изолятов типа 1 была уникальной для каждого вируса. Интересно, что олигонуклеотидная карта одного из вирусов типа 3, выделенного из спинного мозга больного бульбарным полиомиелитом, не отличалась от соответствующей карты вакцинного вируса [135]. Полученные данные позволяют предположить, что этот вирус претерпел менее 10 мутаций. Таким образом, для восстановления вирулентности требуется всего несколько мутаций в соответствующей зоне. Похоже, что многие мутации, обнаруженные в других изолятах, были «молчащими» в отношении нейровирулентности.

Одной из проблем во время первых полевых испытаний вак-

цины против желтой лихорадки была генетическая нестабильность. У вакцинированных, получивших вирус, который прошел 20 дополнительных пассажей после получения исходной популяции [49, 182], в 1—2 % случаев наблюдался энцефалит.

Другая потенциальная сложность заключается в возможности развития в результате вакцинации персистентной инфекции. Это явление встречалось у получавших полиовирусную вакцину детей с иммунодефицитом и иногда вело к развитию паралича [200]. У индивидуумов с нормальной иммунной системой, страдающих вызванным вирусом краснухи артритом, этот вирус был выделен из лимфоцитов через 6 лет после иммунизации или естественной инфекции [21, 22]. Подобное явление было обнаружено только недавно, поэтому его частоту и значение еще предстоит определить. У вакцинного вируса кори персистенция не обнаружена; по-видимому, этот вирус не имеет отношения к развитию синдрома ПСПЭ [107]. Напротив, широкое применение коревой вакцины почти полностью ликвидировало это редкое, но тяжелое следствие персистентной инфекции, вызываемой диким типом вируса кори. Хотя теоретически в первые три месяца беременности существует риск заражения плода вакцинным вирусом краснухи и последующего развития врожденного синдрома краснухи, реальный риск, по-видимому, незначителен [114].

В некоторых условиях встречающийся в природе вирус краснухи дикого типа может интерферировать с вакцинным вирусом, что приводит к снижению эффективности вакцинации. Впервые это явление наблюдалось с живыми вакцинными штаммами вируса полиомиелита, которые интерферировали с самыми разными одновременно циркулирующими кишечными вирусами.

Наконец, следует отметить, что для некоторых вакцинных вирусов, таких как вирус кори, серьезной проблемой является их стабильность. Необходимость хранения и транспортировки коревой вакцины при низкой температуре (4°C) ограничивает ее применение в тропических районах, где при транспортировке и хранении трудно поддерживать низкую температуру.

Направления усовершенствования живых аттенуированных вакцин в будущем

В разработке новых живых вакцин традиционные методы аттенуации не утратили своего значения. Например, недавние попытки аттенуировать вирус ветрянки путем серии пассажей в культуре ткани дали перспективный для вакцины штамм Ока [179]. Этот штамм, по-видимому, удовлетворительно аттенуирован и иммуногенен, однако основы этой аттенуации неизвест-

ны. Во время пассирования в культуре штамм Ока претерпел много мутаций, на что указывает потеря по крайней мере шести рестрикционных сайтов [36]. Недавно в результате серии пассажей на культуре ткани [149] был аттенуирован для шимпанзе вирус гепатита А (HAV). Пассированный на культуре вирус инфицировал шимпанзе, но не вызывал у них гепатита. Наконец, другой подход к аттенуации вакцинных вирусов, исследуемый в настоящее время, — это использование животных вирусов, которые антигенно близкородственны аналогичным вирусам человека. Этот подход, ведущий назад к Дженнеру, в настоящее время проверяется на ротавирусах [201]. После того как для разработки живых вирусных вакцин будут применены новые методы создания вирусов с определенными мутациями или набором генов, традиционные методы достижения аттенуации будут использоваться гораздо реже. Вакцинные штаммы будущего представляют собой вирусы, несущие стабильные вполне определенные и идентифицируемые аттенуирующие мутации или сочетания генов, так как для этих штаммов будут известны генетические основы аттенуации и весь процесс получения вакцин можно будет контролировать непосредственно на всех стадиях их разработки, производства и использования. Определенные аттенуирующие мутации можно индуцировать химическими мутагенами или получить путем делеции части вирусного генома. Их можно также отобрать в процессе роста вируса в условиях, благоприятствующих некоторым желательным мутациям, встречающимся в природе. Следует заметить, что иногда аттенуации достигают смещением генов двух родственных вирусов при получении реассортантного вируса. Такой вирус плохо размножается из-за ограничений, налагаемых продуктами определенных генов или несовместимостью генных продуктов, полученных от двух родителей [121].

Миссенс-мутации

Миссенс-мутации возникают в результате замены оснований в вирусном геноме и отражаются в замене аминокислот в соответствующем участке кодируемого вирусного белка. Часто мутации этого типа можно идентифицировать прямо по наблюдаемым изменениям пораженного белка или косвенно — по изменениям сложной вирусной функции, связанной с измененным белком. Детально исследованы два типа миссенс-мутантов с легко определяемыми фенотипами, причем их проверяли на вирулентность и на потенциальную пригодность для получения аттенуированных мутантов, которые можно было бы использовать в качестве живых вирусных вакцин. К первому типу от-

носятся условно-летальные, температурочувствительные мутанты (*ts*-мутанты), эффективно реплицирующиеся в нижних пределах нормальных температурных границ, но ограниченные в росте при высокой температуре [121]. Второй тип — холодоадаптированные (*ca*-мутанты), эффективно реплицирующиеся при субнормальных температурах [96]. При отборе встречающихся в природе *ca*-мутаций обычно отбираются и *ts*-мутации. Следует подчеркнуть, что процедуры, применяемые обычно для индукции или отбора *ts*- или *ca*-мутаций, как правило, приводят и к другим миссенс-мутациям, которые не имеют *ts*- или *ca*-фенотипа [30].

Аттенуация и иммуногенность *ts*-мутантов вируса гриппа А и вируса RS были определены в исследованиях на экспериментальных животных, а затем на людях. Сначала вирус дикого типа выращивали в присутствии мутагена (5-фторурацила), который индуцирует миссенс-мутации, а затем искомые мутанты идентифицировали по их *ts*-фенотипу. Отбирали *ts*-мутанты, поскольку считали, что *ts*-дефекты будут ограничивать репликацию при более высокой (37°C) температуре в нижних дыхательных путях и не будут мешать размножению при более низкой (28—32°C) температуре в верхних дыхательных путях. При экспериментальных исследованиях на животных мутанты обоих вирусов хорошо размножались в носовой полости, но в легких их размножение было ограничено.

Отобранные для дальнейших исследований *ts*-мутанты вируса гриппа А имели мутации в генах, кодирующих внутренние белки вирионов, так что эти мутации можно было перенести путем реассортации генов в вирусы, несущие поверхностные белки новых эпидемических или пандемических штаммов [20]. При таком подходе подразумевается, что за аттенуацию несущих *ts*-гены реассортантных вирусов ответственны химически индуцированные *ts*-мутации. Что дело обстоит именно так, было показано на реассортантах, полученных из вирусов (*ts*-доноров) с мутациями в генах PB1 и PB2 [101].

Хотя серия реассортантных вирусов гриппа А, несущих гены PB1 и PB2, была удовлетворительно аттенуирована (это было проверено на восприимчивых добровольцах), в процессе работы с ними становилось все очевиднее, что генетическая нестабильность в данном случае представляет собой неразрешимую проблему. В организме восприимчивого ребенка реассортантный *ts*-вирус подвергается сложной серии генетических изменений, в том числе новым «супрессирующим» мутациям. Они ведут к потере *ts*-фенотипа и восстановлению вирулентности, хотя *ts*-реассортант очень плохо реплицируется *in vivo* [184, 185]. Генетическая нестабильность мешает также получению подходящих для использования в целях иммунопрофилакти-

тики *ts*-мутантов вируса RS [20]. Ограничения роста аттенуированных мутантов *in vitro* способствуют сильной положительной селекции новых мутаций, благоприятствующих лучшему росту вируса и позволяющих избежать ограничений, налагаемых исходными мутациями. Опыт, накопленный с *ts*-реассортантами вируса гриппа А и *ts*-мутантами вируса RS, показывает, что для сохранения стабильности мутантов необходимо, чтобы во время репликации в организме полностью восприимчивых индивидуумов они не утратили свой аттенуированный фенотип путем реверсии и(или) новой мутации. Два *ts*-гена *ts*-реассортантов вируса гриппа были неспособны создать такой уровень стабильности.

Большие надежды подают *ca*-мутанты, поскольку мутантный фенотип во время репликации *in vitro* более стабилен [199]. Первоначально вирус — донор *ca*-признака был получен путем адаптации вируса гриппа А к росту при 25°C — субоптимальной температуре для вируса дикого типа [96]. Это было достигнуто серией пассажей с последовательным понижением температуры (от 35 до 25°C) в первичной культуре почек куриного эмбриона. Отобранный таким образом *ca*-мутант был также и *ts*-мутантом. Гены вируса — донора *ca*-признака были затем перенесены нескольким новым антигенным вариантам вируса гриппа А. Полученные при этом реассортанты проявляли *ca*- и *ts*-фенотипы аттенуированного донора [30, 96]. В клинических испытаниях реассортанты, получившие все шесть генов поверхностных антигенов («переносимые» гены) от вируса — донора *ca*-признака, были удовлетворительно аттенуированными и иммуногенными для восприимчивых лиц [121]. Во время заражения восприимчивых добровольцев эти реассортанты сохраняли свои *ca*- и *ts*-фенотипы [121, 199]. Однако у двух реассортантов, которые получили от вируса — донора *ca*-признака только пять из шести переносимых генов, наблюдалась нестабильность *ca*-фенотипа [123]. Детальный анализ вируса-донора указывает, что во время пассажей при низкой температуре в культуре почек куриного эмбриона каждый из шести переносимых генов подвергся по крайней мере одной миссенс-мутации [30]. Эти множественные мутации могут объяснить, почему во время репликации *in vivo* *ca*-реассортанты реже теряют свой аттенуированный фенотип (*ca*- и *ts*-), чем *ts*-реассортанты, которые имеют определяемые миссенс-мутации только в двух из шести переносимых генов. Все мутации, которые были определены в *ca*-реассортантах, так же как и другие мутации, которые не проявляются, могут быть нужны для того, чтобы во время инфицирования полностью восприимчивого индивидуума свести к минимуму потерю аттенуированного фенотипа.

Реассортация генов

Вирусы, имеющие сегментированный геном, могут быть эффективно аттенуированы путем реассортации генов. Как описано ранее, вирулентный вирус гриппа А аттенуируется переносом *ts*- и *sa*-генов от донора-мутанта. Мутации, используемые для этой цели, должны быть локализованы в генах, кодирующих поверхностные антигены, так чтобы мутантные гены могли быть перенесены в реассортантный вирус с нужными поверхностными антигенами, обычно принадлежащими новому эпидемическому или пандемическому штамму. В такой ситуации несущие миссенс-мутации «переносимые» гены ограничивают репликацию вируса, что и приводит к аттенуации.

Аттенуация может быть также достигнута за счет других типов «перенесенных» генов, имеющих мутации, которые нельзя определить простыми лабораторными методами, такими как методы идентификации *ts*- и *sa*-фенотипов [11, 48]. Например, ограничение размножения вируса гриппа человека может быть результатом переноса генов, которые несут мутации, определяющие спектр хозяев (*hr*). Отбор таких мутаций происходит во время адаптации вируса к неприродному хозяину. С этой целью использовали повторные пассажи на куриных эмбрионах, отбирая *hr*-мутации, придающие человеческому вирусу способность к росту *in ovo* [48]. Эти мутации ведут также к ограничению роста вируса в организме его исходного хозяина. Данный подход иллюстрируется на примере высокопассажного адаптированного к куриным эмбрионам штамма PR-8 вируса гриппа (H1N1), который аттенуирован для взрослых, не имеющих вообще или имеющих низкий уровень антител к гемагглютнину этого вируса в сыворотке [11].

Замена четырех или пяти перенесенных генов вирулентного вируса гриппа А человека на соответствующие гены PR-8, как правило, обеспечивает получение реассортантов удовлетворительно аттенуированных для восприимчивых индивидуумов [48]. Однако даже все шесть переносимых генов PR-8 полностью не аттенуируют вирулентный для человека вирус гриппа А. При повторных пассажах PR-8 на куриных эмбрионах идет отбор вирусных белков, способных эффективно функционировать в ходе их сложного взаимодействия в клетках птиц. Вместе с тем *hr*-мутации снижают эффективность измененных вирусных белков в клетках исходного хозяина — человека. Неспособность полного комплекта шести переносимых генов вызывать полную аттенуацию дикого типа вируса гриппа человека свидетельствует о том, что *hr*-мутации не ограничивают размножения вируса в достаточной степени. Для удовлетворительной аттенуации, по-видимому, требуются дополнительные ограничения,

обеспечиваемые несовместимостью белков мутантного и дикого типа вирусов гриппа человека, которые взаимодействуют в таких кооперативных функциях, как транскрипция и репликация вирусной РНК. Подобная интерпретация подтверждается наблюдением, что любой из удовлетворительно аттенуированных реассортантов PR-8 имеет один и тот же смешанный набор полимеразных генов. Первый и третий гены происходят из вируса PR-8, а оставшийся полимеразный ген происходит из вирулентного вируса-родителя [48]. Ни один из других «переносимых» генов PR-8 не обеспечивает регулярно полной аттенуации. Аттенуации вирусов гриппа А человека можно также достигнуть переносом генов от вируса гриппа птиц, размножение которого значительно ограничено в клетках приматов [124]. Упомянутые гены отбирались в природе в течение длительного периода по их способности эффективно функционировать в клетках птиц. В отличие от этого используемые для аттенуации гены PR-8 происходят из вирулентного вируса гриппа А человека и были отобраны по их эффективной функции в клетках куриного эмбриона в течение ограниченного числа пассажей.

Первоначально во время скрининга вируса гриппа А птиц было найдено два штамма, весьма ограниченных по их способности к размножению в легких беличьих обезьян [122]. Затем шесть генов вирулентного вируса гриппа А человека, хорошо репродуцирующегося в легких обезьян, были заменены на соответствующие гены одного из высокорестриктированных штаммов [124]. Образовавшийся реассортант был так же аттенуирован для обезьян, как и его родитель — птичий вирус гриппа. Тем не менее заражение реассортантом индуцировало у обезьян значительную резистентность к последующему заражению вирусом гриппа А человека. При испытаниях на восприимчивых взрослых-добровольцах реассортант вирусов гриппа человека и птиц также оказался удовлетворительно аттенуированным и иммуногенным (Murphy, Clements, неопубликованные данные). Аттенуация генами вируса гриппа птиц отличается от аттенуации генами адаптированного к куриным эмбрионам вируса PR-8 в одном отношении. Последний недостаточно эффективен, для того чтобы придать удовлетворительную аттенуацию без дополнительных ограничений, обеспечиваемых несовместимостью полимеразного комплекса. Напротив, гены вируса гриппа птиц достаточно дефектны, для того чтобы придать желаемый уровень аттенуации без дополнительных ограничений.

Создание стабильных мутантов с помощью технологии рекомбинантной ДНК

Другой подход к созданию стабильных мутантов заключается в использовании делеционных мутаций, которые должны быть стабильными, так как они не подвергаются реверсиям и вряд ли угнетаются новыми мутациями на другом участке вирусного генома. По этой причине в настоящее время предпринимаются усилия для получения стабильных делеционных мутаций, которые делали бы вирус достаточно дефектным, для того чтобы он стал аттенуированным, но не настолько дефектным, чтобы он потерял жизнеспособность. Генетическая хирургия этого типа с использованием рестрикционных эндонуклеаз может быть осуществлена только на молекуле ДНК. Следовательно, вирусные геномы, состоящие из РНК, должны быть транскрибированы в ДНК, а затем в этой форме их можно подвергать манипуляциям. Это ставит нас перед трудной задачей транскрибирования мутантной ДНК в такую РНК, которую можно перенести обратно в инфекционный вирус.

ДНК-содержащие вирусы

Получены стабильные жизнеспособные делеционные мутанты нескольких ДНК-содержащих вирусов животных, субпопуляции которых проявляют уменьшенную способность к репликации. Они представляют интерес, так как уменьшение способности к репликации — это и есть аттенуация. Жизнеспособные делеции могут быть произведены как в неструктурных, так и в структурных генах. Например, в геноме SV40 могут подвергнуться делециям без потери жизнеспособности по крайней мере три участка [8, 26, 183]. Один участок, поздний лидер, является неструктурной областью, а два других представляют собой гены для капсидного белка VP2 и раннего белка — малого Т-антигена [8, 183]. Из этих участков без потери жизнеспособности может быть делетирована довольно большая часть генома [44, 81]. В одном случае Кониг и Лай [81] сконструировали мутант SV40 с двойной делецией, у которого отсутствовало 7,5 % вирусного генома, но жизнеспособность в культуре ткани сохранялась. Был также получен жизнеспособный мутант вируса полиомы с относительно обширной делецией (с сохранением фазы трансляции) в структурном гене для среднего и большого Т-антигенов [60]. Таким образом, как в некодирующих, так и в кодирующих областях паповавирусов существуют участки, которые могут быть делетированы без потери жизнеспособности. Более того, делеция внутри участка любого типа может уменьшить репликативную способность вируса. Некоторые адено-

вирусные мутанты с делецией в раннем участке 1 (E1) также жизнеспособны в клетках человека, но их рост значительно ограничен [71].

Информация, полученная в исследованиях на животных, указывает на то, что делеции в соответствующих участках генома могут давать жизнеспособные мутанты с ограниченной способностью к репликации *in vivo* [102]. Некоторые мутанты вируса полиомы с делециями в ранних участках способны заражать мышей-сосунков, но уровень репликации при этом равен 1/10—1/10 000 уровня репликации вируса дикого типа. Несмотря на такой уровень рестрикции *in vivo*, некоторые из этих делеционных мутантов растут в культуре клеток до такого же высокого титра, как и дикий вирус. В отличие от вирусов дикого типа делеционные мутанты не вызывают персистентную инфекцию у мышей-сосунков [102]. Хотя паповавирусы не являются подходящими кандидатами для разработки вакцин, данные, полученные в опытах с мутантами вируса полиомы, свидетельствуют о том, что делеция в соответствующем участке генома ДНК-содержащих вирусов может ограничивать репликацию вируса *in vivo*, не влияя на его рост в культуре ткани. Более того, делеционные мутанты могут благоприятно изменять патогенез инфекции, превращая персистентную инфекцию в спонтанно затухающую.

Представление об опасности, связанной с онкогенным потенциалом аденовирусов, предотвратило распространение избирательной кишечной иммунизации, направленной против других серотипов аденовирусов, особенно тех, которые важны в педиатрической практике заболеваний дыхательных путей. Несмотря на то что интенсивные исследования связи аденовирусов с развитием рака у человека дали отрицательный ответ на этот вопрос, беспокойство о возможной онкогенности аденовирусов сохраняется [57]. Не исключено, что в будущем эффективная вакцина для детей будет получена с помощью генной инженерии в комбинации с кишечной вакцинацией. Ответственные за трансформацию клеток гены аденовируса типа 5 расположены в пределах 6 % длины вирусного генома в его левой концевой части на том участке, который кодирует ранние функции аденовируса [56]. Мутанты со спонтанными делециями в этой области можно отобрать путем обработки аденовирусной ДНК рестриктазой, вырезающей с левого конца вирусного генома участок, составляющий 4 %, а затем вирусной ДНК, обработанной ферментом, осуществить трансфекцию клеток, трансформированных аденовирусом [71]. Трансформированные аденовирусом клетки используют с целью обеспечения функций, дефектных у искомого делеционного мутанта. Некоторые делеционные мутанты, полученные таким образом, проявляют сле-

дующие необходимые для вакцинных вирусов свойства: а) жизнеспособность, б) ограничение способности к репликации в нормальных клетках человека и в) неспособность к трансформации клеток в культуре [71]. Эти наблюдения позволяют предположить, что можно получить мутанты с делециями в участках трансформации, т. е. дефектные по трансформационной активности, с ограниченной способностью роста в клетках человека. Степень ограничения роста является критическим свойством, так как нужные мутанты должны быть достаточно компетентными, для того чтобы *in vivo* инфицировать достаточное для стимуляции иммунитета количество клеток.

Члены семейства герпесвирусов представляют собой важный объект для разработки вакцин. Недавние успехи в понимании организации генома HSV создают базу для достижения его аттенуации и других желательных свойств путем избирательной инактивации специфических генов. Например, делеция в раннем гене, не являющемся необходимым для способности к продуктивной инфекции у HSV-1 (ген 22), значительно уменьшает нейровирулентность для мышей [157]. Однако при разработке герпесвирусных вакцин аттенуация не является единственной целью, так как главное препятствие в использовании герпесвирусов в виде живых вакцин заключается в склонности некоторых вирусов из этого семейства (HSV-1, HSV-2 и вируса ветрянки) вызывать заболевания после реактивации. Как показали недавние исследования, имеется возможность преодолеть это препятствие путем делеции гена, продукт которого не влияет на способность к продуктивной инфекции, но необходим для проявления латентности и реактивации. Эти свойства, вероятно, определяются двумя генами — геном 22 (ранним альфа-геном) и геном тимидинкиназы (*tk*-геном). Делеция любого из этих генов, так же как и миссенс-мутация в *tk*-гене, уменьшает или предотвращает реактивацию HSV-1 в организме животных [148, 156, 180]. Важно отметить, что эти мутанты могут инфицировать мышей и защищать их против заражения вирусом дикого типа [156, 157].

Другое существенное препятствие в использовании живой герпесвирусной вакцины связано со способностью некоторых из этих вирусов к трансформации клеток в культуре и с той ролью, которую HSV-2 и EBV, возможно, играют в развитии рака у человека [52]. Как только будут определены гены, ответственные за эти функции, можно будет попытаться модифицировать их путем делеции или инактивировать с помощью вставки.

Чтобы встроить гены, кодирующие защитные антигены вирусов, в гетерологичный вирус, аттенуированный для человека, можно также использовать методы рекомбинантной ДНК. В на-

стоящее время этот подход отработывают для использования в качестве аттенуированного вектора вируса осповакцины [98, 141, 171, 172]. Этот вирус имеет длинную историю безопасного использования на людях. Противопоказания к его использованию хорошо известны — генерализованные поражения кожи, такие как экзема, и серьезные дефекты Т-клеток. В вирус осповакцины под контроль его промоторов может быть встроено по крайней мере 22 kb экзогенной ДНК без снижения инфекционности вируса для культуры клеток. Экзогенные гены поверхностных антигенов вируса, таких как поверхностный антиген HBV, гемагглютинин вируса гриппа, gD-антиген HSV, эффективно экспрессируются *in vitro* и *in vivo* при заражении рекомбинантным осповакцинным вектором. Более того, было показано, что такие рекомбинанты, как вирус осповакцины, содержащий либо ген НА вируса гриппа, либо ген поверхностного антигена HBV, либо ген gDHSV, защищают экспериментальных животных [141, 172]. Подобный метод продукции защитных вирусных антигенов в клетках эукариот представляется многообещающим, так как эти антигены должны экспрессироваться на клеточной поверхности вместе с антигенами гистосовместимости хозяина, гарантируя, таким образом, эффективный клеточный и гуморальный ответ.

РНК-содержащие вирусы

Недавно была сконструирована полная клонированная ДНК — копия позитивного РНК-генома вируса полиомиелита путем соединения трех частичных клонов генома этого вируса [152]. Существенно, что данная ДНК инфекционна для культуры обезьяньих и человеческих клеток. Это важное наблюдение позволяет предположить, что клетка распознает соответствующие контрольные сигналы клонированной ДНК вируса полиомиелита и использует эти сигналы для транскрипции полной плюс-цепи РНК, которая инициирует нормальный цикл инфекции. Создание делеционных мутантов вируса полиомиелита и других пикорнавирусов, а также других РНК-содержащих вирусов с позитивным геномом, таких как тогавирусы, должно быть относительно простым, потому что измененная клонированная ДНК может быть непосредственно перенесена в инфекционный вирус путем трансфекции культуры клеток. Таким образом, жизнеспособные делеционные мутанты могут быть идентифицированы и затем оценены в отношении аттенуации и иммуногенности.

Конструирование стабильных делеционных мутантов РНК-содержащих вирусов с негативным геномом представляет собой более трудную задачу в связи с необходимостью переноса

закодированной в клонированной ДНК информации в минус-цепь вирусной РНК и затем обратно в инфекционный вирус. Наибольший прогресс был достигнут с вирусом гриппа А, который имеет сегментированный геном, состоящий из восьми отдельных РНК-генов. В настоящее время клонированную ДНК, содержащую полную последовательность любого гена вируса гриппа, можно сконструировать с помощью методов получения рекомбинантной ДНК [87]. Клонированная ДНК, встроенная в соответствующий вирусный вектор, такой как SV40, экспрессируется в эукариотических клетках как функциональный белок вируса гриппа [55, 62, 177]. Более того, если определенные важные участки клонированной ДНК делетированы, то функция белков вируса гриппа может быть нарушена [177]. Благодаря проведенным экспериментам подготовлена почва для получения делеционных мутантов вируса гриппа А и других вирусов с негативным геномом. Однако еще предстоит разработать методы переноса генетической информации из клонированной ДНК в инфекционный вирус.

Успех создания удовлетворительных вирусных вакцин с помощью рекомбинантной ДНК зависит также от ряда других факторов. Во-первых, рост делеционных мутантов *in vitro* должен быть достаточным, для того чтобы сделать производство вакцины экономически возможным. Во-вторых, их рост *in vivo* должен быть достаточным для стимуляции эффективного иммунитета. В-третьих, предположение, что делеционные (или инсерционные) мутанты являются фенотипически более стабильными, чем миссенс-мутанты, не доказано. Ясно, что реверсия делеционного мутанта к дикому генотипу невозможна. Однако не исключено, что дикий фенотип может быть восстановлен благодаря мутации в другом участке («супрессия») [153].

Литература

1. *Ada G. L.* (1981). Controlling influenza epidemics, *Immunol. Today*, 2, 219—224.
2. *Ada G. L., Leung K.-N., Ertl H.* (1981). An analysis of effector T cell generation and function in mice exposed to influenza A or Sendai viruses, *Immunol. Rev.*, 58, 5—24.
3. *Almond J. W., Cann A. J., Minor P. D., Reeve P., Schild G. C., Hauptmann R., Stanway G.* (1983). Nucleotide sequence from neurovirulent and attenuated strains of poliovirus type 2, *Rev. Infect. Dis.*, 6, 5487—5493.
4. *Arnon R.* (1980). Chemically defined antiviral vaccines, *Ann. Rev. microbiol.*, 34, 593—618.
5. *Arnon R., Shapira M.* (1984). Anti-influenza synthetic vaccine. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 109—113, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
6. *Askonas B. A., McMichael A. J., Webster R. G.* (1982). The immune response to influenza viruses and the problem of protection against infection. In: *Basic and Applied Influenza Research*, ed. by A. S. Beare, pp. 159—188, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

7. Baez M., Palese P., Kilbourne E. D. (1980). Gene composition of high yielding influenza vaccine strains obtained by recombination, *J. Infect. Dis.*, **141**, 362—369.
8. Barkan A., Mertz J. E. (1981). DNA sequence analysis of simian virus 40 mutants with deletions mapping in the leader region of the late viral mRNAs: Mutants with deletions similar in size and position exhibit varied phenotypes, *J. Virol.*, **37**, 730—737.
9. Barry D. W., Mayner R. E., Staton E., Dunlap R. C., Rastogi S. C., Hannah J. E., Blackburn R. J., Nortman D. F., Graze P. R. (1976). Comparative trial of influenza vaccines. I. Immunogenicity of whole virus and split product vaccines in man, *Am. J. Epidemiol.*, **104**, 34—46.
10. Barry D. W., Staton E., Mayner R. E. (1974). Inactivated influenza vaccine efficacy: Diminished antigenicity of split-product vaccines in mice, *Infect. Immunol.*, **10**, 1329—1336.
11. Beare A. S. (1982). Research into the immunization of humans against influenza by means of living viruses. In: *Basic and Applied Influenza Research*, ed. by A. S. Beare, pp. 211—234, CRC Press, Boca Raton, Florida.
12. Bellanti J. A., Sanga R. L., Klutinis B., Brandt B., Artenstein M. S. (1969). Antibody responses in serum and nasal secretions of children immunized with inactivated and attenuated measles-virus vaccines, *N. Engl. J. Med.*, **280**, 628—633.
13. Beneke T. W., Habermehl K.-O., Dieffenhal W., Buchholz M. (1977). Iodination of poliovirus capsid proteins, *J. Gen. Virol.*, **34**, 387—390.
14. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J., Brown F. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence, *Nature (Lond.)*, **298**, 30—33.
15. Braciale T. J., Andrew M. L., Braciale V. L. (1981). Heterogeneity and specificity of cloned lines of influenza-virus-specific cytotoxic T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **153**, 910—923.
16. Burnette W. N., Samal B., Browne J. K., Fenton D., Bitter G. A. (1984). Production of hepatitis B recombinant vaccines, In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 245—250, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
17. Buser F. (1967). Side reaction to measles vaccination suggesting the Arthus phenomenon, *N. Engl. J. Med.*, **277**, 250—251.
18. Cate T. R., Mold N. G. (1975). Increased influenza pneumonia mortality of mice adoptively immunized with node and spleen cells sensitized by inactivated but not live virus, *Infect. Immunol.*, **11**, 908—914.
19. Chanock R. M., Ludwig W., Heubner R. J., Cate T. R., Chu L.-W. (1966). Immunization by selective infection with type 4 adenovirus grown in human diploid tissue culture. I. Safety and lack of oncogenicity and tests for potency in volunteers, *J.A.M.A.*, **195**, 445—452.
20. Chanock R. M., Murphy B. R. (1980). Use of temperature-sensitive and cold-adapted mutant viruses in immunoprophylaxis of acute respiratory tract disease, *Rev. Infect. Dis.*, **2**, 421—432.
21. Chantler J. K., Ford D. K., Tingle A. J. (1981). Rubella-associated arthritis: Rescue of rubella virus from peripheral blood lymphocytes two years postvaccination, *Infect. Immunol.*, **32**, 1274—1280.
22. Chantler J. K., Ford D. K., Tingle A. J. (1982). Persistent rubella infection and rubella-associated arthritis, *Lancet*, **1**, 1323—1325.
23. Chin J., Magoffin R. L., Shearer L. A., Schieble J. H., Lennette E. H. (1969). Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population, *Am. J. Epidemiol.*, **89**, 449—463.
24. Chow M., Baltimore D. (1982). Isolated poliovirus capsid protein VP1 induces a neutralizing response in rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7518.

25. Colman P. M., Varghese J. N., Laver W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, *Nature (Lond)*, **303**, 41—44.
26. Contreras R., Cole C., Berg P., Fiers W. (1979). Nucleotide sequence analysis of two simian virus 40 mutants with deletions in the late region of the genome, *J. Virol.*, **29**, 789—793.
27. Cooper N. R., Welsh R. M., Jr. (1979). Antibody and complement-dependent viral neutralization, *Springer Semin. Immunopathol.*, **2**, 285—310.
28. Cords C. E., Holland J. J. (1964). Alteration of the species and tissue specificity of poliovirus by enclosure of its RNA within the protein capsid of Coxsackie B1 virus, *Virology*, **24**, 492—495.
29. Coulon P., Rollin P. E., Flamand A. (1983). Molecular basis of rabies virus virulence. II. Identification of a site on the CVS glycoprotein associated with virulence, *J. Gen. Virol.*, **64**, 693—696.
30. Cox N. J., Konnecke I., Kendal A. P. (1981). Genetic and biochemical analysis of the A/Ann Arbor/6/60 cold-adapted mutant. In: *Genetic Variation Among Influenza Viruses*, ed. by D. Nayak, pp. 639—652, Academic Press, New York.
31. Davis A. R., Bos T., Ueda M., Nayak D. P., Dowbenko D., Compans R. W. (1983). Immune response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *Escherichia coli*, *Gene*, **21**, 273—284.
32. Dietzschold B., Cohen G., Eisenberg R., Varrichio A. (1984). Synthesis of an antigenic determinant of the herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D which stimulates the protection of virus neutralizing antibodies and which confers protection against a lethal challenge infection of HSV. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 146—149, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
33. Dietzschold B., Wunner W. H., Wiktor T. J., Lopes A. D., Lafon M., Smith C. L., Koprowski H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 70—74.
34. Doherty P. C., Gotze D., Trinchieri G., Zinkernagel R. M. (1976). Models for recognition of virally modified cells by immune thymus-derived lymphocytes, *Immunogenetics*, **3**, 517—524.
35. Éberle R., Russell R. G., Rouse B. T. (1981). Cell-mediated immunity to herpes simplex virus: Recognition of type-specific and type-common surface antigens by cytotoxic T cell populations, *Infect. Immunol.*, **34**, 795—803.
36. Ecker J. R., Hyman R. W. (1981). Varicella-zoster virus vaccine DNA differs from the parental virus DNA, *J. Virol.*, **40**, 314—318.
37. Edman J. C., Hallowell R. A., Valenzuela P., Goodman H. M., Rutter W. J. (1981). Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*, *Nature (Lond.)*, **291**, 503—506.
38. Edmondson W. P., Purcell R. H., Gundelfinger B. F., Love J. W. P., Ludwig W., Chanock R. M. (1966). Immunization by selective infection with type 4 adenovirus grown in human diploid tissue culture. II. Specific protective effect against epidemic disease, *J.A.M.A.*, **195**, 453—459.
39. Emint E. A., Jameson B. A., Wimmer E. (1983). Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides, *Nature (Lond.)*, **304**, 699—703.
40. Emtage J. S., Tacon W. C. A., Catlin G. H., Jenkins B., Porter A. G., Carey N. H. (1980). Influenza antigenic determinants are expressed from haemagglutinin genes cloned in *Escherichia coli*, *Nature (Lond.)*, **283**, 171—174.
41. Ennis F. A., Hua Q.-Y., Riley D., Rook A. H., Schild G. C., Prati R., Potter C. W. (1981). HLA-restricted virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to live and inactivated influenza vaccines, *Lancet*, **2**, 887—891.

42. Ennis F. A., Hua Q.-Y., Schild G. C. (1982). Antibody and cytotoxic T lymphocyte responses of humans to live and inactivated influenza vaccines, *J. Gen. Virol.*, **58**, 273—281.
43. Fenner F. (1974). Prevention and treatment of viral diseases. In: *The Biology of Animal Viruses*, ed. by F. Fenner, B. R. McAuslan, C. A. Mims, J. Sambrook, and D. O. White, pp. 543—586, Academic Press, New York.
44. Feunteun J., Carmichael G., Nicolas J. C., Kress M. (1981). Mutant carrying deletions in the two simian virus 40 early genes, *J. Virol.*, **40**, 625—634.
45. Fields B. N., Greene M. I. (1982). Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: implications for prevention and treatment, *Nature (Lond.)*, **300**, 19—23.
46. Fingers R., Spriggs D. R., Fields B. N. (1982). Host immune response to reovirus: CTL recognize the major neutralization domain of the viral hemagglutinin, *J. Immunol.*, **129**, 2235—2238.
47. Flamand A., Coulon P., Pepin M., Blancou J., Rollin P., Portnoi D. (1984). Immunogenetic and protective power of avirulent mutants of rabies virus selected with neutralizing monoclonal antibodies. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 289—294, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
48. Florent G. (1980). Gene constellation of live influenza A vaccines, *Arch. Virol.*, **64**, 171—173.
49. Fox J. P., Lennette E. H., Manso C., Souza-Aguiar J. R. (1941). Encephalitis in man following vaccination with 17D yellow fever virus, *Am. J. Hygiene*, **36**, 117—141.
50. Fulginiti V. A., Eller J. J., Downie A. W., Kempe C. H. (1967). Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccine. Altered reactivity to measles virus, *J.A.M.A.*, **202**, 1075—1080.
51. Fulginiti V. A., Eller J. J., Sieber O. F., Joyner J. W., Minamitani, Meiklejohn G. (1969). Respiratory virus immunization; I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines: An aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine, *Am. J. Epidemiol.*, **89**, 435—448.
52. Gallaway D. A., McDougall J. K. (1983). The oncogenic potential of herpes simplex viruses: Evidence for a "hit-and-run" mechanism, *Nature (Lond.)*, **302**, 21—24.
53. Ganguly R., Ogra P. L., Regas S., Waldman R. H. (1973). Rubella immunization of volunteers via the respiratory tract, *Infect. Immunol.*, **8**, 497—502.
54. Gerin J. L., Purcell R. H., Lerner R. A. (1984). Recombinant DNA and synthetic peptide approaches to HBV vaccine development: Immunogenicity and protective efficacy in chimpanzees. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 121—125, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
55. Gething J. J., Sambrook J. (1981). Cell-surface expression of influenza hemagglutinin from a cloned DNA copy of the RNA gene, *Nature (Lond.)*, **293**, 620—625.
56. Graham F. L., van der Eb A. J., Heijneker H. L. (1974). Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA, *Nature (Lond.)*, **251**, 687—691.
57. Green M., Wold W. S., Mackey J. K., Ridgen P. (1979). Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, and 6) human adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6606—6610.
58. Green N., Alexander H., Olson A., Alexander S., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A. (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin, *Cell*, **28**, 477—487.
59. Greenberg H. B., Flores J., Kalica A., Wyatt R., Jones R. (1983). Gene coding assignments for growth restriction and neutralization and subgroup

- specificities of the W and DS-1 strains of human rotavirus, *J. Gen. Virol.*, **64**, 313—324.
60. Griffin B. E., Maddock C. (1979). New classes of virable deletion mutants in the early region of polyoma virus, *J. Virol.*, **31**, 645—656.
 61. Hardy K., Stahl S., Kupper H. (1981). Production in *B. subtilis* of hepatitis B core antigen and of major antigen of foot and mouth disease virus, *Nature (Lond.)*, **293**, 481—483.
 62. Hartman J. R., Nayak D. P., Fareed G. C. (1982). Human influenza virus hemagglutinin is expressed in monkey cells using simian virus 40 vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 233—237.
 63. Hicks J. T., Ennis F. A., Kim E., Verdonitz M. (1978). The importance of an intact complement pathway in recovery from a primary viral infection. Influenza in decompemented and C5 deficient mice. *J. Immunol.*, **121**, 1437.
 64. Hirsch R. L., Griffin D. E., Winkelstein J. A. (1980). The role of complement in viral infections. II. The clearance of Sindbis virus from the bloodstream and central nervous system of mice depleted of complement, *J. Infect. Dis.*, **141**, 212—217.
 65. Horstmann D. M. (1979). Viral vaccines and their ways, *Rev. Infect. Dis.*, **1**, 502—516.
 66. Horstmann D. M. (1982). Control of poliomyelitis: A continuing paradox, *J. Infect. Dis.*, **146**, 540—551.
 67. Horstmann D. M., Opton E. M., Klemperer R., Llado B., Vignec A. J. (1964). Viremia in infants vaccinated with oral poliovirus vaccine (Sabin), *Am. J. Hygiene*, **79**, 47—63.
 68. Horvath B. L., Fornosi F. (1964). Excretion of SV40 virus after oral administration polio vaccine, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **11**, 271—275.
 69. Hoskins T. W., Davies J. R., Smith A. J., Miller C. L., Allchin A. (1979). Assessment of inactivated influenza-A vaccine after three outbreaks of influenza A at Christ's Hospital, *Lancet*, **1**, 33—35.
 70. Jackson D. C., Murray J. M., White D. O., Fagan C. N., Tregear G. W. (1982). Antigenic activity of a synthetic peptide comprising the "Loop" region of influenza virus hemagglutinin, *Virology*, **120**, 273—276.
 71. Jones N., Shenk T. (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells, *Cell*, **17**, 683—689.
 72. Kalica A. R., Greenberg H. B., Wyatt R. G., Flores J., Sereno M. M., Kapikian A. Z., Chanock R. M. (1981). Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens, *Virology*, **112**, 385—390.
 73. Kapikian A. Z., Mitchell R. H., Chanock R. M., Shvedoff R. A., Stewart C. E. (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine, *Am. J. Epidemiol.*, **89**, 404—421.
 74. Kempe C. H., Bowles C., Meiklejohn G., Berge T. O., St. Vincent L., Sundara-Babu B. V., Govindarajan S., Ratnakannan N. R., Downie A. W., Murthy V. R. (1961). The use of vaccinia hyperimmune gammaglobulin in the prophylaxis of smallpox, *Bull. WHO*, **25**, 41—48.
 75. Kendal A. P., Bozeman F. M., Ennis F. A. (1980). Further studies of the neuraminidase content of inactivated influenza vaccines and the neuraminidase antibody responses after vaccination of immunologically primed and unprimed populations, *Infect. Immunol.*, **29**, 966—971.
 76. Kew O. M., Nottay B. K., Hatch M. H., Nakano J. H., Obijeski J. F. (1981). Multiple genetic changes can occur in the oral poliovaccines upon replication in humans, *J. Gen. Virol.*, **56**, 337—347.
 77. Kew O. M., Pallansch M. A., Omilianowski D. R., Rueckert R. R. (1980). Changes in three of the four coat proteins of oral polio vaccine strain derived from type 1 poliovirus, *J. Virol.*, **33**, 256—263.
 78. Kitamura N., Semler B., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dor-

- ner A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA, *Nature* (Lond.), **291**, 547—553.
79. Kleid D. G., Yansura D., Small B., Dowbenko D., Moore D. M., Grubman M. J., McKercher P. D., Morgan D. O., Robertson B. H., Bachrach H. L. (1981). Cloned viral protein vaccine for food-mouth disease: response in cattle and swine, *Science*, **214**, 1125—1129.
 80. Kohl S., Loo L. S. (1982). Protection of neonatal mice against herpes simplex virus infection: probable in vivo antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Immunol.*, **129**, 370—376.
 81. Konig M., Lai C.-J. (1979). A general approach to construct double deletion mutants of SV40, *Virology*, **96**, 277—280.
 82. Koszinowski U. H., Allen H., Gething M.-J., Waterfield M. D., Klenk H.-D. (1980). Recognition of viral glycoproteins by influenza A-specific cross-reactive cytolytic T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **154**, 945—958.
 83. Krugman S. (1963). The clinical use of gamma globulin, *N. Engl. J. Med.*, **269**, 195—201.
 84. Krugman S. (1982). The newly licensed hepatitis B vaccine: Characteristics and indications for use, *J.A.M.A.*, **247**, 2012—2015.
 85. Kupper H., Keller W., Kurz C., Forss S., Schaller H., Franze R., Strohmaier K., Marquardt O., Zaslavsky V. G., Hofschneider P. H. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*, *Nature* (Lond.), **289**, 555—559.
 86. Kurrle R., Wagner H., Rollinghoff, Rott R. (1979). Influenza virus-specific T cell-mediated cytotoxicity: Integration of the virus antigen into the target cell membrane is essential for target cell formation, *Eur. J. Immunol.*, **9**, 107—111.
 87. Lai C.-J., Markoff L. J., Zimmerman S., Cohen B., Berndt J., Chanock R. M. (1980). Cloning DNA sequences from influenza viral RNA segments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 210—214.
 88. Langbeheim H., Arnon R., Sela M. (1976). Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4636—4640.
 89. Lasky L. A., Dowbenko D., Simonsen C., Berman P. W. (1984). Production of a herpes simplex virus subunit vaccine by genetically engineered mammalian cell lines. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 189—194, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 90. Lerner R. A., Green N., Alexander H., Liu F.-T., Sutcliffe J. G., Shinnick T. M. (1981). Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3403—3407.
 91. Leung K.-N., Ada G. L. (1980). Cells mediating delayed-type hypersensitivity in the lungs of mice infected with an influenza A virus, *Scand. J. Immunol.*, **12**, 393—400.
 92. Leung K.-N., Ashman R. B., Ertl H. C. J., Ada G. L. (1980). Selective suppression of the cytotoxic T cell response to influenza virus in mice, *Eur. J. Immunol.*, **10**, 803—810.
 93. Linnemann C. C., Jr., Hutchinson L., Rotte T. C., Hegg M. E., Schiff G. M. (1974). Stability of the rabbit immunogenic marker of RA 27/3 rubella vaccine virus after human passage, *Infect. Immunol.*, **9**, 547—549.
 94. Lu L. Y., Askonas B. A. (1980). Cross-reactivity for different type A influenza viruses of a cloned T-killer cell line, *Nature* (Lond.), **288**, 164—165.
 95. Lund G. A., Ziola B. R., Salmi A., Scraba D. G. (1977). Structure of the mengo virion. V. Distribution of the capsid polypeptides with respect to the surface of the virus particle, *Virology*, **78**, 35—44.

96. Maassab H. F., Monto A. S., DeBorde D. C., Cox N. J., Kendal A. P. (1981). Development of cold recombinants of influenza virus as live virus vaccines. In: *Genetic Variation Among Influenza Viruses*, ed. by D. P. Nayak, pp. 617—637, Academic Press, New York.
97. Mackett M., Archard L. (1979). Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure, *J. Gen. Virol.*, **45**, 683—701.
98. Mackett M., Smith G. L., Moss B. (1984). A general method for the production and selection of vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 301—305, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
99. Malek L. T., Soostmeyer G., Garvin R. T., James E. (1984). The rabies glycoprotein gene is expressed in *E. coli* as a renatured polypeptide. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 203—208, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
100. Mann J. J., Waldman R. H., Togo Y., Heimer G. G., Dawkins A. T., Kasel J. A. (1968). Antibody response in respiratory secretions of volunteers given live and dead influenza virus, *J. Immunol.*, **100**, 726—735.
101. Massicot J. G., Murphy B. R., van Wyke K., Huang K.-Y., Chanock R. M. (1980). ts P1 and P3 genes are responsible for satisfactory level of attenuation of ts-1A2 recombinants bearing H1N1 or H3N2 surface antigens of influenza A virus, *Virology*, **106**, 187—190.
102. McCance D. J. (1981). Growth and persistence of polyoma early region deletion mutants in mice, *J. Virol.*, **39**, 958—962.
103. McDonald J. C. (1963). Gamma-globulin for prevention of rubella in pregnancy, *Br. Med. J.*, **2**, 416—418.
104. Melnick J. L., Proctor R. O., Ocampo A. R., Diwan A. R., Ben-Porath E. (1966). Free and bound virus in serum after administration of oral poliovirus vaccine, *Am. J. Epidemiol.*, **84**, 329—342.
105. Merz D. C., Scheid A., Choppin P. W. (1980). Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection, *J. Exp. Med.*, **151**, 275—288.
106. Merz D. C., Scheid A., Choppin P. W. (1981). Immunological studies of the functions of paramyxovirus glycoproteins, *Virology*, **109**, 94—105.
107. Meyer H. M., Jr., Hopps H. E., Parkman P. D., Ennis F. A. (1978). Control of measles and rubella through use of attenuated vaccines, *Am. J. Clin. Pathol.*, **70**, 128—135.
108. Meyer H. M., Jr., Hopps H. E., Parkman P. D., Ennis F. A. (1978). Review of existing vaccines for influenza, *Am. J. Clin. Pathol.*, **70**, 146—152.
109. Michel M.-L., Sobzack E., Lamy D., Tiollais P. (1984). Synthesis and secretion of hepatitis B surface antigen particles in transfected animal cells, In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 233—237, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
110. Mills J. V., van Kirk J. E., Wright P. F., Chanock R. M. (1971). Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness, *J. Immunol.*, **107**, 123—130.
111. Minor P. D., Kew O., Schild G. C. (1982). Poliomyelitis—Epidemiology, molecular biology and immunology, *Nature (Lond.)*, **299**, 109—110.
112. Minor P. D., Schild G. C., Bootman J., Evans D. M. A., Ferguson M., Reeve P., Spitz M., Stanway G., Cann A. J., Hauptmann R., Clarke L. D., Mountford R. C., Almond J. W. (1983). Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization, *Nature (Lond.)*, **301**, 674.
113. Miyahara A., Toh-E. A., Nozaki C., Hamada F., Ohtomo N., Matsubara K. (1983). Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1—5.
114. Morbidity and Mortality Weekly Report (1983). Rubella vaccination during

- pregnancy—United States, 1971—1982, *M. M. W. R.*, **32**, 429—437.
115. *Monath T. P., Kinney R. M., Schlesinger J. J., Brandriss M. W., Bres P.* (1983). Ontogeny of yellow fever 17D vaccine: RNA oligonucleotide fingerprint and monoclonal antibody analyses of vaccines produced world-wide, *J. Gen. Virol.*, **64**, 627—637.
 116. *Moore M., Katona P., Kaplan J. E., Schonberger L. B., Hatch M. H.* (1982). Poliomyelitis in the United States. 1969—1981, *J. Infect. Dis.*, **146**, 558.
 117. *Morris A. G., Lin Y.-L., Askonas B. A.* (1982). Immune interferon release when a cloned cytotoxic T-cell line meets its correct influenza-infected target cell, *Nature (Lond.)*, **295**, 150—152.
 118. *Mortimer E. A., Jr., Lepow M. L., Gold E., Robbins F. C., Burton G. J., Fraumeni J. F., Jr.* (1982). Long-term follow-up of persons inadvertently inoculated with SV40 as neonates, *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1317—1318.
 119. *Muller G. M., Shapira M., Arnon R.* (1982). Antiinfluenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 569—573.
 120. *Murphy B. R., Chalhub E. G., Nusinoff S. R., Kasel J., Chanock R. M.* (1973). Temperature-sensitive mutants of influenza virus. III. Further characterization of the ts-1 [E] influenza A recombinant (H_3N_2) virus in man, *J. Infect. Dis.*, **128**, 479—487.
 121. *Murphy B. R., Chanock R. M.* (1981). Genetic approaches to the prevention of influenza A virus infection, In: *Genetic Variation Among Influenza Viruses*, ed. by D. P. Nayak, pp. 601—615, Academic Press, New York.
 122. *Murphy B. R., Hinshaw V. S., Sly D. L., London W. T., Hosier N. T., Wood F. T., Webster R. G., Chanock R. M.* (1982). Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys, *Infect. Immunol.*, **37**, 1119—1126.
 123. *Murphy B. R., Holley H. P., Jr., Berquist E. J., Levine M. M., Spring S. B., Maassab H. F., Kendal A. P., Chanock R. M.* (1979). Cold-adapted variants of influenza A virus: Evaluation in adult seronegative volunteers of A/Scotland/840/74 and A/Victoria/3/75 cold-adapted recombinants derived from the cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 strain, *Infect. Immunol.*, **23**, 253—259.
 124. *Murphy B. R., Sly D. L., Tierney E. L., Hosier N. T., Massicot J. G., London W. T., Chanock R. M., Webster R. G., Hinshaw V. S.* (1982). Influenza A reassortant virus derived from avian and human influenza A virus is attenuated and immunogenic in monkeys, *Science*, **218**, 1330—1332.
 125. *Nader P. R., Horwitz M. S., Rousseau J.* (1968). Atypical exanthem following exposure to natural measles. Eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine, *J. Pediatr.*, **72**, 22—28.
 126. *Nakano J. H., Hatch M. H., Thieme M. L., Nottay B.* (1978). Parameters for differentiating vaccine-derived and wild poliovirus strains, *Prog. Med. Virol.*, **24**, 178—206.
 127. *Nathanson N.* (1982). Eradication of poliomyelitis in the United States, *Rev. Infect. Dis.*, **4**, 940—945.
 128. *Nathanson N., Langmuir A. D.* (1963). The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the spring of 1955. I. Background, *Am. J. Hygiene*, **78**, 16—28.
 129. *Nayak D. P., Davis A. R., Ueda M., Bos T. J., Sivasubramanian N.* (1984). Expression of influenza virus glycoproteins. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 165—172, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 130. *Nomoto A., Omata T., Toyoda H., Kuge S., Horie H., Kataoka Y., Genba Y., Nakano Y., Imura N.* (1982). Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5793—5797.
 131. *Norrby E., Enders-Ruckle G., ter Meulen V.* (1975). Differences in the appearance of antibodies to structural components of measles virus after immunization with inactivated and live virus, *J. Infect. Dis.*, **132**, 262—269.

132. *Norrby E., Gollmar Y.* (1975). Identification of measles virus-specific hemolysis-inhibiting antibodies separate from hemagglutination-inhibiting antibodies, *Infect. Immunol.*, **11**, 231—239.
133. *Norrby E., Penttinen K.* (1978). Differences in antibodies to the surface components of mumps virus after immunization with Formalin-inactivated and live virus vaccines, *J. Infect. Dis.*, **138**, 672—676.
134. *Norrild B.* (1980). Immunochemistry of herpes simplex virus glycoproteins, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **90**, 67—106.
135. *Nottay B. K., Kew O. M., Hatch M. H., Heyward J. T., Obijeski J. F.* (1981). Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans, *Virology*, **108**, 405—423.
136. *Ogra P. L., Karzon D. T.* (1969). Poliovirus antibody response in serum and nasal secretions following intranasal inoculation with inactivated poliovaccine, *J. Immunol.*, **102**, 15—23.
137. *Ogra P. L., Karzon D. T.* (1969). Distribution of poliovirus antibody in serum, nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine, *J. Immunol.*, **102**, 1423—1430.
138. *Ogra P. L., Karzon D. T., Righthand F., MacGillivray M.* (1968). Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection, *N. Engl. J. Med.*, **279**, 893—900.
139. *Ogra P. L., Kerr-Grant D., Umana G., Dzierba J., Weintraub D.* (1971). Antibody response in serum and nasopharynx after naturally acquired and vaccine-induced infection with rubella virus, *N. Engl. J. Med.*, **285**, 1334—1339.
140. *Orvell C., Norrby E.* (1977). Immunologic properties of purified Sendai virus glycoproteins, *J. Immunol.*, **119**, 1882—1887.
141. *Paoletti E., Panicali D., Lipinskas B. R., Mercer S., Wright M., Samsonoff C.* (1984). Construction of live recombinant vaccines using genetically-engineered poxviruses. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 295—299, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
142. *Para M. F., Baucke R. B., Spear P. G.* (1982). Glycoprotein gE of herpes simplex virus type 1: Effects of anti-gE on virion infectivity and on virus-induced Fc-binding receptors, *J. Virol.*, **41**, 129—136.
143. *Parkman P. D., Hopps H. E., Rastogi S. C., Meyer H. M., Jr.* (1977). Summary of clinical trials of influenza virus vaccines in adults, *J. Infect. Dis.*, **136**, S722—S730.
144. *Perkins J. C., Tucker D. N., Knopf H. L. S., Wenzel R. P., Kapikian A. Z., Chanock R. M.* (1969). Comparison of protective effect of neutralizing antibody in serum and nasal secretions in experimental rhinovirus type 13 illness, *Am. J. Epidemiol.*, **90**, 519—526.
145. *Peterson L. J., Benson W. W., Graeber F. O.* (1955). Vaccination-induced poliomyelitis in Idaho, *J.A.M.A.*, **159**, 241—244.
146. *Potter C. W.* (1982). Inactivated influenza virus vaccine. In: *Basic and Applied Influenza Research*, ed. by A. S. Beare, pp. 119—204, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
147. *Pourcel C., Sobzack E., Dubois M.-F., Gervais M., Drouet J., Tiollais P.* (1982). Antigenicity and immunogenicity of hepatitis B virus particles produced by mouse cells transfected with cloned viral DNA, *Virology*, **121**, 175—183.
148. *Price R. W., Khan A.* (1981). Resistance of peripheral autonomic neurons to in vivo productive infection by herpes simplex virus mutants deficient in thymidine kinase activity, *Infect. Immunol.*, **34**, 571—580.
149. *Provost P. J., Banker F. S., Giesa P. A., McAleer W. J., Buynak E. B., Hilleman M. R.* (1982). Progress toward a live, attenuated human hepatitis A vaccine (41387), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **170**, 8—14.

150. Quinnan G. V., Kirmani N., Rook A. H., Manischewitz J. F., Jackson L., Moreschi G., Santos G. W., Saral R., Burns W. H. (1982). HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 7—13.
151. Racaniello V. R., Baltimore D. (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4887—4891.
152. Racaniello V. R., Baltimore D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells, *Science*, **214**, 916—919.
153. Ramig R. F., Fields B. N. (1979). Revertants of temperature-sensitive mutants of reovirus: Evidence for frequent extragenic suppression, *Virology*, **92**, 155—167.
154. Rauh L. W., Schmidt R. (1965). Measles immunization with killed virus vaccine, *Am. J. Dis. Child.*, **109**, 232—237.
155. Rector J. T., Lausch R. N., Oakes J. E. (1982). Use of monoclonal antibodies for analysis of antibody-dependent immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection, *Infect. Immunol.*, **38**, 168—174.
156. Roizman B., Meignier B., Norrild B., Wagner J. L. (1984). Bioengineering of herpes simplex virus variants for potential use as live vaccines. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (in press).
157. Roizman B., Warren J., Thuning C. A., Fanshaw M. S., Norrild B., Meignier B. (1982). Application of molecular genetics to the design of live herpes simplex virus vaccines, *Dev. Biol. Stand.*, **52**, 287—304.
158. Ross A. H. (1962). Modification of chicken pox in family contacts by administration of gamma globulin, *N. Engl. J. Med.*, **267**, 369—376.
159. Rowlands D. J., Clarke B. E., Carroll A. R., Brown F., Nicholson B. H., Bittle J. L., Houghten R. A., Lerner R. A. (1984). Chemical basis for variation in the major antigenic site eliciting neutralizing antibodies in FMDV. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 93—101. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
160. Russell S. M., Liew F. Y. (1979). T cells primed by influenza virion internal components can cooperate in the antibody response to haemagglutinin, *Nature (Lond.)*, **280**, 147—148.
161. Sabin A. B. (1957). Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine, *J.A.M.A.*, **164**, 1216—1223.
162. Sabin A. B., Arechiga A. F., de Castro J. F., Sever J. L., Madden D. L., Shekarchi I., Albrecht P. (1983). Successful immunization of children with and without maternal antibody by aerosolized measles vaccine, *J.A.M.A.*, **249**, 2651—2662.
163. Sabin A. B., Boulger L. R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains, *J. Biol. Stand.*, **1**, 115—118.
164. Schlesinger J. J., Brandriss M. W., Monath T. R. (1983). Monoclonal antibodies distinguish between wild and vaccine strains of yellow fever virus by neutralization, hemagglutination inhibition, and immune precipitation of the virus envelope protein, *Virology*, **125**, 8—17.
165. Schmaljohn A. L., Johnson E. D., Dalrymple J. M., Cole G. A. (1982). Non-neutralizing monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus encephalitis, *Nature (Lond.)*, **297**, 70—72.
166. Schonberger L. B., Bregman D. J., Sullivan-Bolyai J. Z., Keenlyside R. A., Ziegler D. W., Retailliau H. F., Eddins D. L., Bryan J. A. (1979). Guillain-Barré syndrome following vaccination in the national influenza immunization program, United States, 1966—1977, *Am. J. Epidemiol.*, **110**, 105—123.
167. Schonberger L. B., Hurwitz E. S., Katona P., Holman R. C., Bregman D. J. (1981). Guillain-Barré syndrome: Its epidemiology and associations with influenza vaccination, *Ann. Neurol.*, **9** (Suppl.), 31—38.

168. Sela M., Mozes E. (1979). The challenge of the combined use of synthetic adjuvants, *Springer Semin. Immunopathol.*, **2**, 119—132.
169. Sissons J. G. P., Oldstone M. B. A. (1980). Killing of virus-infected cells: The role of antiviral antibody and complement in limiting virus infection, *J. Infect. Dis.*, **142**, 442—448.
170. Smith C. B., Purcell R. H., Bellanti J. A., Chanock R. M. (1966). Protective effect of antibody to parainfluenza type 1 virus, *N. Engl. J. Med.*, **275**, 1145.
171. Smith G. L., Mackett M., Moss B. (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen, *Nature (Lond.)*, **302**, 490—495.
172. Smith G. L., Mackett M., Murphy B. R., Moss B. (1984). Vaccinia virus recombinants expressing genes from pathogenic agents have potential as live vaccines. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 313—317, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
173. Smith T. J., Buescher E. L., Top F. H., Jr., Altemeier W. A., McCown J. M. (1970). Experimental respiratory infection with type 4 adenovirus vaccine in volunteers: Clinical and immunological responses, *J. Infect. Dis.*, **122**, 239.
174. Spriggs D. R., Bronson R. T., Fields B. N. (1983). Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism, *Science*, **220**, 505—507.
175. Spriggs D. R., Fields B. N. (1982). Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of haemagglutinin antigenic variants, *Nature (Lond.)*, **297**, 68—70.
176. Stratowa C., Doehmen J., Wang Y., Hofschneider P. H. (1984). Expression of hepatitis B surface antigen in eukaryotic cells using viral vectors. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 239—243, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
177. Sveda M. M., Markoff L. J., Lai C.-J. (1982). Cell surface expression of the influenza virus hemagglutinin requires the hydrophobic carboxy-terminal sequences, *Cell*, **30**, 649—656.
178. Szmuness W., Stevens C. E., Harley E. J., Zang E. A., Oleszko W. R., William D. C., Sadowsky R., Morrison J. M., Kellner A. (1980). Hepatitis B vaccine: Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States *N. Engl. J. Med.*, **303**, 833—841.
179. Takahashi M., Okuno Y., Otsuka T., Osame J., Takamizawa A., Sasada T., Kubo T. (1975). Development of a live attenuated varicella vaccine, *Biken. J.*, **18**, 25—33.
180. Tenser R. B., Dunstan M. E. (1979). Herpes simplex virus thymidine kinase expression in infection of the trigeminal ganglion, *Virology*, **99**, 417—422.
181. Theiler M. (1951). The Virus. In: *Yellow Fever*, ed. by G. K. Strode, pp. 39—137, McGraw-Hill, New York.
182. Theiler M., Smith H. H. (1939). The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus, *J. Exp. Med.*, **65**, 767—787.
183. Thimmappaya B., Shenk T. (1979). Nucleotide sequence analysis of viable deletion mutants lacking segments of the simian virus 40 genome coding for small-T antigen, *J. Virol.*, **30**, 668—673.
184. Tolpin M. D., Clements M. L., Levine M. M., Black R. E., Saah A. J., Anthony W. C., Cisneros L., Chanock R. M., Murphy B. R. (1982). Evaluation of a phenotypic revertant of the A/Alaska/77-ts-1A2 reassortant virus in hamsters and in seronegative adult volunteers: Further evidence that the temperature-sensitive phenotype is responsible for attenuation of ts-1A2 reassortant viruses, *Infect. Immunol.*, **36**, 645—650.
185. Tolpin M. D., Massicot J. G., Mullinix M. G., Kim H. W., Parrott R. H., Chanock R. M., Murphy B. R. (1981). Genetic factors associated with loss of the temperature-sensitive phenotype of the influenza A/Alaska/77-ts-1A2 recombinant during growth in vivo, *Virology*, **112**, 505—517.

186. Valenzuela P., Tekamp-Olson P., Coit D., Heberlein U., Kuo G., Masiarz F. R., Medina-Selby M. A., Rosenberg S., Whitney J. Burlingame A., Rutter W. J. (1984). Hepatitis B vaccine: Characterization of hepatitis B antigen particles produced in yeast. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 209—213, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
187. Waldman R. H., Coggins W. J. (1972). Influenza immunization: Field trial on a university campus, *J. Infect. Dis.*, **126**, 242—248.
188. Waldman R. H., Wigley F. M., Small P. A., Jr. (1970). Specificity of respiratory secretion antibody against influenza virus, *J. Immunol.*, **105**, 1477.
189. Wampler D. E., Buynak E., Harder B. J., Herman A. C., Hilleman M. R., McAleer W., Scolnick E. (1984). Hepatitis B vaccine purification by immune-affinity chromatography. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. A. Lerner and R. M. Chanock, pp. 251—256, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
190. Waters T. D., Anderson P. S., Jr., Beebe G. W., Miller R. W. (1972). Yellow fever vaccination. ALV, and cancer risk in man, *Science*, **177**, 76—77.
191. Watson R. J., Weis J. H., Salstrom J. S., Engquist L. W. (1982). Herpes simplex virus type-1 glycoprotein D gene: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, *Science*, **218**, 381—384.
192. Webster R. G., Askonas B. A. (1980). Cross-protection and cross-reactive cytotoxic T cells induced by IV vaccines in mice, *Eur. J. Immunol.*, **10**, 396—401.
193. Weiner H. L., Fields B. N. (1977). Neutralization of reovirus: The gene responsible for the neutralization antigen, *J. Exp. Med.*, **146**, 1303—1310.
194. Weis J. H., Engquist L. W., Salstrom J. S., Watson R. J. (1983). An immunologically active chimaeric protein containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D, *Nature (Lond.)*, **302**, 72—74.
195. Wells M. A., Ennis F. A., Albrecht P. (1981). Recovery from a viral respiratory tract infection II. Passive transfer of immune spleen cells to mice with influenza pneumonia, *J. Immunol.*, **126**, 1042—1046.
196. Wilcox W. C., Ginsberg H. S. (1963). Production of specific neutralizing antibody with soluble antigens of type 5 adenovirus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 37—42.
197. Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. (1981). Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation, *Nature (Lond.)*, **289**, 373—378.
198. World Health Organization Consultative Group (1982). The relation between acute persisting spinal paralysis and poliomyelitis vaccine: Result of a ten year inquiry, *Bull. WHO*, **60**, 231—242.
199. Wright P. F., Okabe N., McKee K. T., Jr., Maassab H. F., Karzon D. T. (1982). Cold-adapted recombinant influenza A virus vaccines in seronegative young children, *J. Infect. Dis.*, **146**, 71—79.
200. Wyatt H. V. (1973). Poliomyelitis in hypogammaglobulinemics, *J. Infect. Dis.*, **128**, 802—806.
201. Wyatt R. G., Mebus C. A., Yolken R. H., Kalica A. R., James H. D., Jr., Kapikian A. Z., Chanock R. M. (1979). Rotaviral immunity in gnotobiotic calves: Heterologous resistance to human virus induced by bovine virus, *Science*, **203**, 548—550.
202. Yap K. L., Braciale T. J., Ada G. L. (1979). Role of T-cell function in recovery from murine influenza infection, *Cell. Immunol.*, **43**, 341—351.
203. Yelverton E., Norton S., Obijeski J. F., Goeddel D. V. (1983). Rabies virus glycoprotein analogs: Biosynthesis in *Escherichia coli*, *Science*, **219**, 614.
204. Yoneyama T., Hagiwara A., Hara M., Shimojo H. (1982). Alteration in oligonucleotide fingerprint patterns of the viral genome in poliovirus type 2 isolated from paralytic patients, *Infect. Immunol.*, **37**, 46—53.

Пикорнавирусы и их репликация

Рональд Р. Рюкерт¹

Пикорнавирусы принадлежат к числу самых мелких из известных РНК-содержащих вирусов, отсюда и происходит их название: *pico* — очень маленькие, *rna* — РНК. Они составляют одно из наиболее многочисленных и важных семейств возбудителей заболеваний человека и сельскохозяйственных животных. Пикорнавирусами являются и вирус ящура (FMDV), и полиовирус, и вирус гепатита А человека. К этому же семейству относятся риновирусы человека — основные возбудители простудных заболеваний.

Экономическое и медицинское значение пикорнавирусов естественным образом определяет их заметную роль в развитии современной вирусологии. Вирус ящура, важнейший возбудитель заболеваний крупного рогатого скота, был фактически первым вирусом животных, открытым Леффлером и Фрошем [173] в 1898 г. Они обнаружили, что возбудитель ящура проходит через фильтры Беркфельда, т. е. он намного мельче, чем все другие известные патогенные микроорганизмы. Сообщение о том, что полиомиелит также вызывается вирусом, появилось примерно десятилетие спустя [165], однако название «полиовирус» вошло в употребление лишь примерно с 1955 г. [311].

Стимулом к изучению молекулярной биологии пикорнавирусов послужило обнаружение у полиовируса способности к размножению в культивируемых клетках [92]. Этому изучению способствовало также создание метода бляшек для определения инфекционности [82] и методов очистки и кристаллизации полиовируса [280, 292], сделавших возможным применение рентгеноструктурного анализа в этой области. Существенным моментом послужило и установление питательных потребностей

¹ Ronald R. Rueckert, Biophysics Laboratory of the Graduate School and Department of Biochemistry of the College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706.

клеток в культуре [85]. Используя питательные среды определенного состава и радиоактивные предшественники с известной удельной радиоактивностью [71, 72], можно было метить вирусные макромолекулы в синхронно зараженных культурах [70]. Чувствительность клеток к вирусу связана с наличием у них специфических рецепторов [73, 132]; установлению этого факта способствовало обнаружение инфекционности изолированной РНК пикорнавирусов [3, 51].

Большое значение для молекулярной биологии в целом имели еще три открытия: а) обнаружение первой РНК-зависимой РНК-полимеразы [14]; б) идентификация спиральной двухцепочечной репликативной формы вирусной РНК [217]; в) обнаружение того, что генные продукты полиовируса образуются в результате протеолитического расщепления большого полипротеина [295]. Идея о том, что это расщепление обеспечивает получение нескольких белков на моноцистронной матрице полиовирусной мРНК, послужила основанием к предположению о моноцистронном характере всех эукариотических мРНК в отличие от полицистронного характера мРНК прокариот [144].

Классификация

Поиски эффективных вакцин, в особенности против ящура [27] и полиомиелита [24, 209, 236], привели к обнаружению множества агентов, родственных полиовирусу, и теперь число серотипов превышает 231 (табл. 18.1).

Роды

В настоящее время семейство пикорнавирусов разделяют на четыре рода: *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Rhinovirus* и *Aphthovirus* (вирус ящура). Представители этих родов практически неразличимы под электронным микроскопом.

Энтеровирусы, называемые так потому, что они населяют пищеварительный (кишечный) тракт, включают не только полиовирусы (три серотипа), но также вирусы Коксаки (23 серотипа), ЕСНО (32 серотипа), энтеровирусы человека типов 68—72, в том числе вирус гепатита А [59, 210], и многие энтеровирусы животных (37 серотипов) [208, 209].

Все кардиовирусы [вирус Колумбия SK, вирус энцефаломиокардита (ЕМС), вирус Маус Эльберфельд (МЕ), вирус ММ и вирус менго] принадлежат к одному серотипу и рассматриваются здесь как штаммы вируса ЕМС. Они обычно считаются вирусами мышей, хотя круг их хозяев среди прочих видов включает человека, свиней, слонов и белок.

Таблица 18.1. Семейство пикорнавирусов ¹⁾

Род	Число серотипов	Члены
<i>Enterovirus</i>	3 23 6 32 4 1 1 18 7 11 1	Полновирусы человека 1—3 Вирусы Коксаки человека А1-22,24 (А23 — вирус ЕСНО-9) ²⁾ Вирусы Коксаки человека В1-6 ³⁾ (вирус везикулярной болезни свиней очень похож на вирус Коксаки В5) [112] Эховирусы человека 1—9, 11—27, 29—34; вирус ЕСНО-10 — реовирус типа 1 ²⁾ , ⁴⁾ , вирус ЕСНО-28 — риновирус человека типа 1А ²⁾ Энтеровирусы человека типов 68—71 Вирус гепатита А человека (энтеровирус типа 72) Виллюйский вирус Энтеровирусы обезьян типов 1—18 Энтеровирусы крупного рогатого скота типов 1—7 Энтеровирусы свиней типов 1—11 Полновирус мышей (вирус Тейлера ТО, FA, GD7)
<i>Cardiovirus</i>	1	Вирус энцефаломиокардита (ЕМС), вирус менго, вирус Маус Эльберфельд (МЕ), вирус Колумбия SK, MM
<i>Rhinovirus</i>	113? 2	Риновирусы человека 1—89 Риновирусы крупного рогатого скота 1—2
<i>Aphthovirus</i>	7	Вирусы ящура 1—7 (серотипы А, С, О, SAT-1, 2, 3, Азия-1)
Неклассифицированные	>3	Риновирусы лошадей 1 и 2, вирус паралича сверчков, С-вирус дрозофилы, пикорнавирус травяной моли
		>231

¹⁾ Так называемые пикорнавирусы кошек теперь помещают в семейство калицивирусов.
²⁾ Освободившиеся номера не используются.

³⁾ Вирусы Коксаки впервые были выделены в г. Коксаки, шт. Нью-Йорк, отсюда и происходит их название.

⁴⁾ ЕСНО — это начальные буквы английских слов enteric cytopathic human orphans, цитопатогенные человеческие кишечные вирусы-сироты.

Риновирусы человека, названные так из-за своей адаптации к области носоглотки, являются наиболее важными возбудителями простудных заболеваний как у взрослых, так и у детей [79, 118, 149]. Официально существует 89 серотипов риновирусов [150], однако число вирусов-кандидатов продолжает увеличиваться и теперь, вероятно, превышает 113 [194]. Большинство пикорнавирусов, выделенных из дыхательных путей человека, кислотоустойчивы, и это свойство является определяющим признаком риновирусов [148, 209, 211, 305].

Афтовирусы (вирус ящура) заражают парнокопытных (осо-

бенно крупный рогатый скот, коз, свиней, овец), а иногда и человека. Идентифицировано семь иммунотипов афтовирусов: А, С, О, Азия-1 и южно-африканские типы SAT-1, SAT-2 и SAT-3. На основании реакции связывания комплемента в пределах этой группы выделено по крайней мере 53 подтипа. Их серологические свойства значительно различаются, что затрудняет классификацию и иммунизацию. Афтовирусы очень лабильны и быстро инактивируются при $pH < 7$.

Некоторые вирусы, такие как риновирусы лошадей 1 и 2 [222, 250] и ряд пикорнавирусов насекомых [180, 218, 286], еще не распределены по родам. Сообщалось, что один из этих вирусов, вирус паралича сверчков, дает перекрестные серологические реакции с вирусом ЕМС [301].

Устойчивость к pH

Энтеровирусы и кардиовирусы кислотоустойчивы, они сохраняют жизнеспособность при pH 3 и даже ниже, в то время как риновирусы и афтовирусы разрушаются уже при $pH < 6$ (табл. 18.2). Это различие, вероятно, отражает адаптацию к условиям существования, поскольку энтеровирусы на пути к своему местообитанию — кишечнику — должны пройти через кислую среду в желудке. Кислотолабильные риновирусы и афто-

Таблица 18.2. Физические свойства пикорнавирусов [221]

Группа	pH-стабильность	Плавучая плотность		Коэффициент седиментации ¹⁾
		вирион	оболочка	
Энтеровирусы	Стабильны при pH 3—9 ²⁾	1,34	1,30	156S
Кардиовирусы ³⁾	То же ³⁾	1,34	1,30 ⁴⁾	156S
Риновирусы человека (HRV)	Лабильны при $pH < 6$	1,39—1,42	1,29	149S ⁵⁾
Афтовирусы ⁶⁾	Лабильны при $pH < 7$	1,43—1,45	1,30	142—146S
Риновирусы лошадей ⁷⁾	Лабильны при $pH < 6$	1,45	1,29	156S

¹⁾ По отношению к полиовирусу (156 S) в градиенте сахарозы (ионная сила 0,04—0,15, pH 7,3—7,6).

²⁾ При низкой ионной силе некоторые вирусы Коксаки лабильны даже при нейтральном pH [56].

³⁾ В эту группу входят вирусы ЕМС, менге, МЕ, Колумбия, СК и вирус ММ. Лабильны в интервале pH 4,5—6,5 в присутствии 0,1 M Cl⁻ или Br⁻ [269].

⁴⁾ Оболочки кардиовирусов стабильны только в строго определенных условиях [170].

⁵⁾ Эта величина получена в растворе, содержащем 0,1 M KCl. Коэффициент седиментации риновируса человека типа 14 обратимо увеличивается на 7% в присутствии 2 M CsCl [161].

⁶⁾ Вирусы ящура.

⁷⁾ Официально еще не признан отдельным родом.

вирусы обитают в носоглотке, и кислотоустойчивость не является их обязательным свойством. Более того, возможно, структура, ответственная за кислотолабильность вирионов, сообщает им какие-то селективные преимущества, поскольку высоколабильные афтовirusы принадлежат к наиболее инфекционным из известных вирусов.

Геномная РНК и ее продукты

Чувствительность к рибонуклеазе

Геном пикорнавирусов представлен одноцепочечной РНК, выполняющей функцию мРНК. Удельная инфекционность изолированной РНК составляет примерно одну миллионную часть от инфекционности вириона. О том, что эта инфекционность действительно связана со свободной РНК, а не со следовыми количествами интактных вирионов, свидетельствует ее чрезвычайно высокая чувствительность к рибонуклеазе ($< 0,01$ мкг/мл). В связи с этим при выделении инфекционной РНК работают в хирургических перчатках, чтобы предотвратить загрязнение препарата микроскопическими частичками, содержащими нуклеазы, которые могут попасть с кожи. Напротив, инфекционность интактных вирионов, где РНК защищена белковой оболочкой, совершенно не изменяется при воздействии рибонуклеазой, даже когда ее концентрация в миллион раз превышает упомянутую выше величину. Для утраты инфекционности достаточно, чтобы в РНК был внесен одиночный разрыв, независимо от того, изолирована ли РНК или находится в составе вирусной частицы.

Структура РНК пикорнавирусов

Пикорнавирусы содержат единственную цепь РНК; ее 3'-конец полиаденилирован, а к 5'-концу ковалентно присоединен низкомолекулярный белок, обозначаемый VPg. Первой РНК пикорнавирусов, для которой удалось определить нуклеотидную последовательность, была РНК полиовируса типа 1 [159, 257]. Вслед за этой пионерской работой было проведено секвенирование РНК других пикорнавирусов. Оказалось, что длина этих РНК значительно варьирует — от 7430 до 8450 оснований (табл. 18.3). У более длинных РНК — вирусов ЕМС и ящура — между белком VPg и началом белок-кодирующего района расположен участок poly(C).

Таблица 18.3. Свойства РНК некоторых пикорнавирусов

Вирус	РНК ¹⁾	Poly(A) ²⁾	Мол. масса ³⁾	VPg ⁴⁾	Poly(C)	Полипро- теин ⁴⁾
Полновирус	7433 ⁵⁾	62	$2,58 \cdot 10^6$	22	—	2207
Человеческий ри- новирус 14	7209 ⁶⁾	74	$2,50 \cdot 10^6$	23	—	2178
Вирус ЕМС	7840 ⁷⁾	35	$2,70 \cdot 10^6$	20	+	2290
Вирус ящура ⁸⁾	8450 ⁸⁾	100	$2,74 \cdot 10^6$	23, 24 ⁹⁾	+	2332

¹⁾ Число оснований, исключая участок poly(A) варьирующей длины.

²⁾ Среднее число [2].

³⁾ Рассчитано для натриевой соли VPg-содержащей РНК. Натрий и калий — основные катионы, найденные в полиовирусе, — необходимы для нейтрализации всех отрицательно заряженных фосфатных остатков в плотно упакованной сердцевине вируса. В риновирусе человека типа 14 примерно 2000 этих катионов металла заменены полиаминами, в основном спермидином и спермином.

⁴⁾ Число аминокислотных остатков.

⁵⁾ Штамм Махони тип 1 [159]. Вакцинный штамм Сэбина содержит 7441 (тип 1), 7440 (тип 2) и 7432 (тип 3) оснований соответственно [303].

⁶⁾ По данным работы [41].

⁷⁾ По данным работы [233].

⁸⁾ По данным работ [44, 104].

⁹⁾ Содержит три разных VPg [103].

Poly (A)

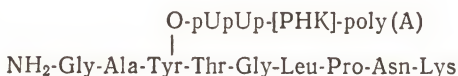
Подобно большинству других РНК, выполняющих функцию мРНК, геном пикорнавирусов содержит на 3'-конце участок poly(A) варьирующей длины. Эта вариабельность сохраняется и после очистки вируса клонированием из бляшки (негативной колонии). Тем не менее средний размер варьирующего участка генетически обусловлен и изменяется от 35 для вируса ЕМС до 100 у афтовирусов (табл. 18.3).

При отщеплении poly(A) рибонуклеазой Н инфекционность полиовирусной РНК заметно снижается; это свидетельствует о том, что poly(A) выполняет какую-то важную функцию [291]. Какую именно — неизвестно, установлено лишь, что молекулы РНК с короткой poly(A) обладают меньшей удельной инфекционностью [136]. Минус-цепи репликативных предшественников содержат на 5'-конце poly(U) такой же длины и гетерогенности [323], указывая на то, что 3'-конец генетически детерминирован; тем не менее существуют указания и на посттранскрипционное удлинение участка poly(A) [291].

VPg-РНК

Как мы уже говорили, с 5'-концом геномных РНК всех пикорнавирусов ковалентно связан маленький, кодируемый вирусом белок, который не нужен для инфекционности РНК [226].

Этот белок, обозначаемый VPg (от англ. *virion protein, genome*), присоединен к 5'-pUpUp через фосфодиэфирную связь, образующуюся с фенольной (O⁴)-гидроксильной группой тирозинового остатка [318]. Длина VPg у различных вирусов варьирует слабо (табл. 18.3, столбец 5). Ниже приведена структура аминокислотного триптического фрагмента полиовирусного VPg, связанного с РНК:



Геном вируса ящура содержит три tandemно расположенных гена VPg [103], а в вирусной РНК ранее были обнаружены три разных VPg [158]. Геномы полиовируса, риновируса человека типа 14 и вируса ЕМС содержат только одну форму VPg. Сообщения о наличии двух форм VPg в вирионной РНК вируса ЕМС и полиовируса — это, по-видимому, артефакт, связанный с дезамидированием остатка аспарагина в аминоконцевом фрагменте, показанном выше [260]. Полагают, что VPg — это важный элемент, участвующий в упаковке РНК в вирионы. Появляются и данные о том, что он играет важную роль в инициации синтеза пикорнавирусных РНК (см. разд. «Синтез вирусных РНК и белков»).

Участок poly (C)

РНК кардио- и афтовирuсов содержит участок полицитидиловой кислоты [poly(C)], который не обнаруживается в РНК энтеро- и риновирусов человека [30]. Эти poly(C)-участки, биологическая роль которых неясна, расположены в некодирующей области, перед сайтом инициации трансляции (рис. 18.1, *вверху*). В кардиовирусной РНК poly(C)-участок находится на расстоянии примерно 150 оснований от 5'-конца [48, 241], а в афтовирuсной РНК — на расстоянии примерно 400 оснований [122, 267].

В пределах данного изолята вируса poly(C)-участок гомогенен по размеру, но у разных изолятов варьирует (80—250 для кардиовирусов, 100—170 для афтовирусов) [23]. Таким образом, длина poly(C) может служить полезным параметром при идентификации штамма вируса. У природных изолятов poly(C)-участок часто бывает более длинным, чем у лабораторных штаммов, но попытки связать его длину и вирулентность пока оказались безуспешными [57, 122].

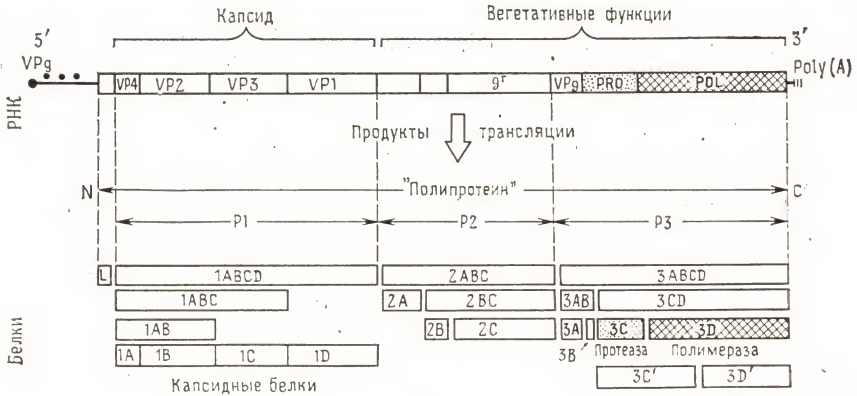


Рис. 18.1. Структура пикорнавирусного генома и схема расщепления полипротеина. Белковые предшественники P1, P2 и P3 расщепляются далее на четыре, три и четыре конечных продукта соответственно. Большинство расщеплений осуществляется вирус-специфической протеазой 3C^{PRO}. Предполагается, что за расщепление сайтов L-1A, 1D-2A и 3C'-3D' ответственна клеточная протеаза. Сайт 1A-1B, расщепляемый в ходе созревания вируса, отличается от всех остальных; это указывает на то, что он расщепляется какой-то третьей протеазой. Аминоконцы белков оболочки P1 и 1A блокированы. Участок полицитидиловой кислоты (...) в 5'-некодирующей области и лидерный белок L обнаружены у вирусов ЕМС и ящура, но не у полиовируса и риновируса человека типа 14. Полипротеин вируса ящура содержит три 3B(VPg)-сегмента, а все остальные пикорнавирусы — только один. g^r — Маркер резистентности к гуанидину, генетический локус, который влияет на действие ингибитора, предположительно блокирующего инициацию синтеза РНК. Номенклатура белков соответствует принятой в 1983 г. Европейской исследовательской группой по молекулярной биологии пикорнавирусов [274].

Белок-кодирующая область

Общая стратегия белкового синтеза, используемая пикорнавирусами, изучается на протяжении уже более десятилетия, и основные ее особенности установлены. РНК содержит одну протяженную рамку считывания, кодирующую полипептидную цепь. Эта цепь, называемая полипротеином, расщепляется в процессе трансляции, поэтому полноразмерный белок обычно не образуется. В результате каскада расщеплений, катализируемых двумя или тремя протеазами, образуется 11 или 12 продуктов; для семи из них удалось (по крайней мере частично) установить функцию, которую они выполняют (рис. 18.1). Сегменты 1A, 1B, 1C и 1D области P1 представляют собой элементы субъединицы белковой оболочки (протомера). Продукт 3C — это протеаза [234, 296], которая участвует в большинстве (но не во всех) актов расщепления полипротеина [121], 3B —

это VPg [230, 288], а продукт 3D — фермент, способный удлинять растущую цепь РНК на РНК-матрице [102, 183].

Белок 3CD полиовируса и риновируса человека может расщепляться двумя способами с образованием либо 3C+3D, либо 3C'+3D' [204, 272]. Второй способ реализуется также в клетках, зараженных афтовиром [80], но не в клетках, зараженных кардиовирусом [33, 34]. В случае полиовируса расщепление по первому пути происходит между глутамином и глицином [288] и, по-видимому, катализируется 3C^{pro}, тогда как расщепление по второму пути происходит между тирозином и глицином и катализируется, вероятно, клеточной протеазой [121]. Биологическое значение расщепления по второму пути неясно.

Функции белков А, В и С области Р2 изучены хуже, но, согласно косвенным данным, белок 2С участвует в синтезе РНК, а белок 2В определяет круг хозяев. Так, продукт 2С несет маркер устойчивости к гуанидину — генетический признак вируса ящура [277] и полиовируса [8]. Этот локус влияет на действие гуанидина, который, предположительно, блокирует инициацию РНК [40, 300]. Мутанты риновируса 2 человека, отобранные на расширенный круг хозяев по способности расти в мышинных клетках, обнаруживают специфические изменения в структуре белка 2В.

Генетическая рекомбинация

Способность РНК-содержащих вирусов, в том числе пикорнавирусов, к рекомбинации была установлена в ходе генетических исследований более двадцати лет назад [126, 169], но прямое биохимическое подтверждение этому удалось получить лишь недавно [157, 263]. Пионерские работы Купера [53] показали, что можно построить генетическую карту, основываясь на частотах рекомбинации, полученных в опытах по скрещиванию между температурочувствительными (*ts*) мутантами полиовируса, дефектными по белку оболочки и синтезу РНК.

Длина такой рекомбинационной карты (примерно 1,2% для полиовируса [53] и 3% для афтовируса [197]) указывает на то, что по крайней мере от 1 до 3% новосинтезированной вирусной РНК является рекомбинантной. С другой стороны, частота ошибок при репликации РНК по оценкам составляет $\sim 10^{-4}$ на одно основание [133]. Для РНК, сходной по размеру с РНК пикорнавирусов, это соответствует примерно одной ошибке на геном. Эти соображения указывают на то, что рекомбинация у пикорнавирусов происходит с весьма высокой частотой, примерно 1% от частоты замен оснований.

Кью и Ноттей [155] показали, что рекомбинация — это не просто лабораторный курьез, она осуществляется и *in vivo*.

Авторы идентифицировали природные штаммы, содержащие сегменты трех серотипов вирусов пероральной полиовакцины. Такие рекомбинанты, вероятно, возникли при введении живой пероральной вакцины в виде смеси всех трех серотипов (тривалентной вакцины), что создает возможность заражения одной клетки кишечника всеми тремя вирусами.

Механизм рекомбинации РНК пока неясен. Высказывалось предположение, что вирусная РНК-полимераза, связанная со своим новосинтезированным транскриптом, случайно отсоединяется от исходной матрицы, а затем вновь присоединяется к другой матрице и заканчивает синтез [54].

Вирион

Физические свойства

Полиовирус относится к наиболее подробно охарактеризованным вирусам. В табл. 18.4 описаны некоторые его физические свойства. Вирион имеет примерно сферическую форму. Он лишен липидной оболочки, поэтому его инфекционность практически не меняется при обработке органическими растворителями, такими как эфир или хлороформ. Согласно электронно-микроскопическим данным, диаметр частиц варьирует от 24 до 30 нм. Столь широкий диапазон размеров обусловлен уплотнением частиц или разной проницаемостью их для красителей (солей тяжелых металлов) в ходе высушивания и окрашивания, проводимых при приготовлении образцов для электронной микроскопии. Лиофилизированные препараты теряют 99,99% или более исходной инфекционности; это означает, что вода играет важную роль в поддержании целостности нуклеокапсида. Недеструктивные методы, такие как седиментационное равновесие [32], малоугловое рентгеновское рассеяние, рентгеновская дифракция [93, 160], с помощью которых измеряют диаметр влажных частиц, показывают, что диаметр вириона находится в интервале 29,8—30,7 нм.

Вирион имеет сердцевину, состоящую из РНК; длина этой РНК после ее освобождения из вирусной частицы и вытягивания перед проведением электронно-микроскопических измерений составляет примерно 2,5 мкм. Плотная упакованная РНК окружена тонкой белковой оболочкой (указана стрелкой на рис. 18.2, А). Иногда наблюдается сбрасывание этой оболочки (рис. 18.2, В) с последующей ее диссоциацией на субъединицы, имеющие форму козырька фуражки (рис. 18.2, Г). Эта простая конструкция «РНК-сердцевина — белковая оболочка» была

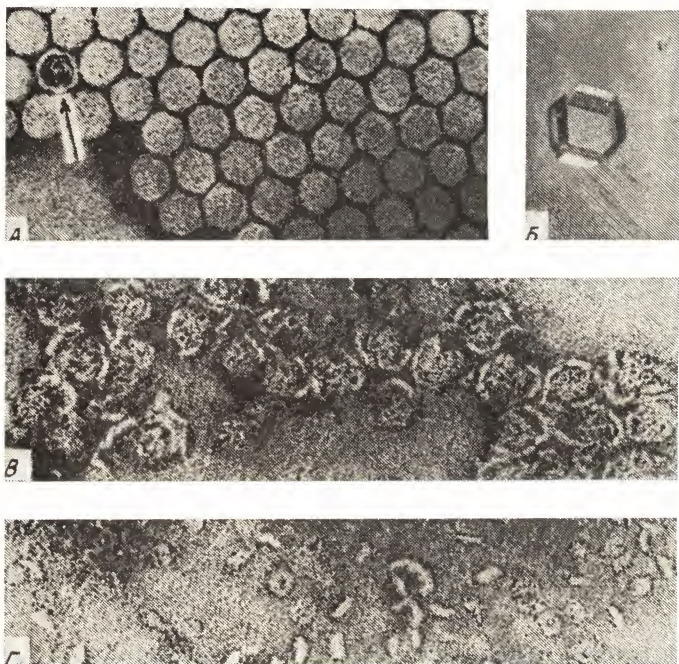


Рис. 18.2. А. Очищенные вирионы, образующие регулярную двумерную решетку. Их сердцевина состоит из плотно упакованной РНК и окружена белковым чехлом толщиной примерно 5 нм. Стрелкой указан свободный от РНК пустой капсид, называемый природным верхним компонентом (ПВК). Б. Хороший кристалл полиовируса; $\times 64$. Фотография приводится с любезного разрешения Ф. Шеффера. Мелкие кристаллические скопления вируса часто обнаруживаются и в цитоплазме зараженных клеток. В. Разрушающиеся вирионы (рН 6, 20 °С); белковые оболочки частично сброшены, но сердцевина остается intactной. Г. Дальнейшая диссоциация вирионов (рН 6, 37 °С) с освобождением искривленных пластинок («козырьков фуражек») [310]. Сердцевина теперь полностью развернута, но цепи РНК слишком тонки для того, чтобы их можно было увидеть при таком способе окрашивания (2%-ный уранилацетат). Фотографии вируса ящура приведены с любезного разрешения К. Вакеса. $\times 288\,000$.

впервые предложена для мелких растительных вирусов и основывалась на данных по малоугловому рентгеновскому рассеянию [7].

Белковая оболочка

В соответствующих условиях пикорнавирусы образуют стабильные кристаллы очень высокого качества [9, 93, 127, 280]. Рентгеноструктурный анализ таких кристаллов (см. рис. 18,2, Б)

Таблица 18.4. Физические свойства полиовириона ¹⁾

Форма	Близка к сферической
Диаметр (гидратированная частица)	Около 30,5 нм
Симметрия (рентгеновские данные)	5:3:2 (икосаэдрическая)
Капсомеры (электронная микроскопия)	Нечеткие (32, 42, 60)
$S_{20,w}$	$156 \cdot 10^{-13} \text{ c}^{-1}$
$\frac{D}{20,w}$	$1,40 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{c}^{-1}$
\bar{v}	0,685 мл/г
Масса вириона ²⁾	$8,58 \cdot 10^6$
РНК (каплевая соль) ²⁾ , %	31,6
Белок, %	68,4
Число вирионов на 1 мг	$7,07 \cdot 10^{13}$
Число вирионов/ A_{260}	$9,4 \cdot 10^{12}$

¹⁾ По данным обзора [270].²⁾ Рассчитано из полной нуклеотидной последовательности [159].

указывает на наличие у них икосаэдрической симметрии (5:3:2) [99]. В основе этой симметрии лежит регулярная организация идентичных белковых субъединиц, связанных осями симметрии 5-го, 3-го и 2-го порядков в белковой оболочке [62]. Для оболочек, состоящих из идентичных субъединиц, икосаэдрическая симметрия означает, что эта оболочка состоит из нескольких ($n=1, 3, 4, 7, \dots$) целых наборов по 60 полипептидных цепей [45].

Капсомеры

Для многих вирусов кратность наборов n можно определить исходя из организации капсомеров на поверхности частицы. Однако у пикорнавирусов капсомеры обычно просматриваются плохо (рис. 18.2, А). В тех редких случаях, когда капсомеры все же видны, они недостаточно отчетливы, и для их подсчета необходимы опыт и значительная доля воображения [196]. Точное число капсомеров, которое, по данным разных авторов, составляет 32, 42 или 60, по всей видимости, зависит от вируса и метода приготовления препарата для проведения электронно-микроскопических исследований. Плеоморфность капсомеров пикорнавирусов можно объяснить разной группировкой трех основных цепей 60-субъединичной оболочки (см. рис. 6 в работе [269]).

Протомер

Все пикорнавирусы, включая полиовирус [184], кардиовирусы [271], риновирусы человека [206] и афтовирусы [298, 307], содержат четыре полипептидные цепи: VP1, VP2, VP3 и VP4

Таблица 18.5. Молекулярные массы белков оболочки некоторых пикорнавирусов

Белок	Полиовирус [159]	ЕМС [233]	Вирус ящура [44]	HRV-14 [41]
VP1	33521	31703	23267	32381
VP2	29985	29026	24669	28503
VP3	26410	25141	24323	26195
VP4	7385	7247	8480	7178
VP1, VP2, VP3, VP4	97301	93117	80648	94257

Додекаэдрическая природа белковой оболочки

Икосаэдрическую оболочку из четырех неидентичных белков можно построить множеством способов [269]. Первые данные об основах организации белков (рис. 18.3, А) и додекаэдрической природе пикорнавирусной оболочки были получены при анализе продуктов кислотной диссоциации кардиовируса (штамм МЕ). В присутствии хлорид- или бромид-ионов в концентрации 0,1 М при pH 6 вирион при повышении температуры диссоциирует на инфекционную РНК, VP4 и два типа пентамеров (рис. 18.4). Возможно, эти пентамеры соответствуют «козьям», которые видны на рис. 18.2, В и Г.

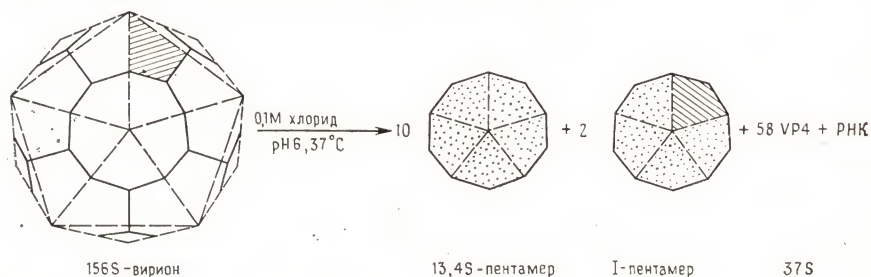


Рис. 18.4. Экспериментальная основа додекаэдрической модели вирионов пикорнавирусов. При прогревании при 37 °С и концентрации хлорид-ионов 0,1 М при pH 6 вирус ЕМС (штамм МЕ) диссоциирует с освобождением инфекционной РНК, белка VP4 и растворимых 13,4S-пентамеров, структура которых (VP1, VP2, VP3)₅ была установлена с помощью электрофореза и анализа методом седиментационного равновесия (табл. 18.6). В присутствии 2М мочевины 13,4S-пентамеры диссоциируют на 5S-протомеры (VP1, VP2, VP3), изображенные здесь в виде треугольников с точками. Эта ступенчатая диссоциация показывает, что пентамеры соединены в оболочке связями, чувствительными к хлорид-ионам, а протомеры удерживаются в пентамерах при помощи связей другого типа, чувствительных к мочедине. Около 1/6 общего количества белка содержит VP0, VP1, VP2 и VP3 в соотношении 1:5:4:5 и находится в виде нерастворимого осадка. Ему приписывают гипотетическую структуру (I-пентамер), содержащую четыре (VP1, VP2, VP3)-мономер (треугольники с точками) и один (VP0, VP1, VP3)-мономер (заштрихованный треугольник) [84].

13,4 S-субъединицы [187] представляют собой искривленные пластинки толщиной примерно 4,8 нм и шириной 16 нм [186]. При обработке 2М мочевиной они диссоциируют на 4,7 S-субъединицы [271]. Стехиометрические данные согласуются с результатами определения молекулярной массы обеих субъединиц и показывают, что 4,7 S-субъединица является мономером, содержащим по одной копии каждого из белков VP1, VP2 и VP3, а 13,4 S-субъединица—это пентамер 4,7 S-мономера (табл. 18.6).

Таблица 18.6. Две белковые субъединицы, получаемые из вируса ЕМС

Субъединица	Структура	Мол. масса		
		электрофоретические данные [83]	теоретическая величина ¹⁾	седиментационное равновесие [84]
4,7S	(VP1, VP2, VP3)	88 000	85 870	86 000
13,4S	(VP1, VP2, VP3) ₅	440 000	429 350	420 000

¹⁾ Для (VP1, VP2, VP3) данные взяты из табл. 18.5.

Таким образом, белковая оболочка вируса ЕМС ведет себя как конструкция из 12 пентамеров, соединенных одним типом кислоточувствительного связующего домена. Мономеры в пентамерах в свою очередь удерживаются вместе доменом другого типа, чувствительным к мочеине. Иными словами, диссоциацию можно объяснить наличием всего двух типов связующих доменов в составе каждой из идентичных субъединиц. Одни домены скрепляют пентамеры, другие связывают мономеры в пентамеры. Как мы увидим, сборка оболочки пикорнавирусов может осуществляться благодаря работе этих доменов в обратном порядке [84].

12S-субъединица, получающаяся при кислотной диссоциации вируса ящура, также содержит эквимоллярные количества белков VP1, VP2 и VP3 [298], но вначале ее считали тримером (VP1, VP2, VP3)₃. В то же время по электронно-микроскопическим данным ее размер примерно соответствует половине диаметра вириона (рис. 18.2, В и Г), что ближе к размеру пентамера [310]. Имея в виду меньший размер протомера вируса ящура (табл. 18.5), различие в скорости седиментации между 12S-субъединицами афтовирuсов и 13,4S-субъединицами вируса ЕМС легко объяснить различием масс двух пентамеров (табл. 18.7).

Таблица 18.7. Расчетные коэффициенты седиментации пентамеров некоторых пикорнавирусов

Вирус	Пентамер	Мол. масса ¹⁾	Теоретическое значение $S_{20,w}^{(2)}$
Вирус ящура	VP1, VP2, VP3	361 000	11,9
Вирус ящура	VP0, VP1, VP3	403 000	12,9
ЕМС	VP0, VP1, VP3	466 000	14,2
Полиовирус	VP0, VP1, VP3	486 000	14,6

¹⁾ Из табл. 18.5.²⁾ Рассчитано из соотношения $S_1/S_2 = (\text{Мол. масса}_1/\text{Мол. масса}_2)^{2/3}$ с использованием известных значений молекулярной массы и коэффициента седиментации 13,4S-субъединицы вируса ЕМС.

Плавающая плотность пикорнавирусов

Пикорнавирусы довольно сильно различаются по плавучей плотности (табл. 18.2, столбец 3). Равновесная плотность для энтеро- и кардиовирусов составляет 1,34 г/мл, а для риновирусов лошадей и некоторых афтовирусов — 1,45 г/мл. Последняя величина характерна для вирусов с содержанием РНК порядка 30—35% [287]. Полиовирус обладает необычно низкой плотностью, поскольку его непроницаемая для ионов цезия оболочка предотвращает связывание этих тяжелых атомов с РНК [192]. Цезий включается в полиовирионы при выращивании зараженных клеток в среде, обогащенной CsCl. Таким образом, можно связать плотность вируса и содержание в нем цезия и показать, что включение цезия сопровождается вытеснением калия — противоиона, который в норме нейтрализует фосфатные остатки полиовирусного генома. При искусственном полном замещении 7500 атомами цезия полиовирус имеет ожидаемую плавучую плотность 1,45 г/мл [192]. Обнаружены также «тяжелые» частицы полиовируса, но они практически неинфекционны. Такие тяжелые, с низкой инфекционностью частицы обычно наблюдаются и в случае других энтеровирусов, в том числе вирусов Коксаки, вирусов ЕСНО и вируса гепатита А.

Высокая плавающая плотность вирусов ящура и риновирусов лошадей (табл. 18.2, столбец 3) показывает, что цезий связывается практически со всеми фосфатными группами РНК. Промежуточная плавающая плотность риновирусов человека, составляющая примерно 1,40 г/мл, обусловлена неполным замещением калия ионами цезия (примерно 5000 атомов на вирион) [207]. Места, в которых обмен не произошел, заняты полиаминами спермином и спермидином, которые не могут диффундировать через полупроницаемую белковую оболочку и поэтому не вытесняются из комплексов с РНК [105].

Масса вирионов пикорнавирусов

Массы вирионов, рассчитанные для 60-субъединичных вирусов, исходя из значений молекулярных масс, полученных из данных об аминокислотных последовательностях, свидетельствуют о значительных различиях в размере частиц (табл. 18.8). Относительно меньшие значения массы риновирусов и афтоввирусов согласуются с меньшими коэффициентами седиментации для этих вирусов (табл. 18.2).

Таблица 18.8. Массы вирионов пикорнавирусов ¹⁾

Вирус	Масса, МДа
Полиовирус	8,42
Вирус ЕМС	8,29
HRV-14	8,16
Вирус ящура	7,58

¹⁾ Рассчитано по данным табл. 18.3 и 18.5.

Соотношение числа частиц и инфекционных единиц

Концентрацию вирусных частиц можно рассчитать исходя из результатов спектрофотометрических измерений [273] высокоочищенных препаратов вируса. Оптическая плотность 1,00 при длине волны 260 нм соответствует концентрации $9,4 \cdot 10^{12}$ частица/мл. Если концентрация частиц известна, не составляет труда определить число частиц, соответствующих одной бляшкообразующей единице (БОЕ) в стандартном тесте. Величина, полученная при подсчете бляшек на чашке, показанной на рис. 18.5, составляет 200 частица/БОЕ; это отвечает инфекционности только 0,5%.

Эффективность образования бляшек пикорнавирусами обычно довольно низка; она составляет 0,1—2%, даже когда предпринимаются меры для удаления дефектных или инактивированных частиц [147, 161, 206, 243, 285]. Потеря инфекционности обычно связана с тепловыми повреждениями (например, с денатурацией вирионных белков), окислением тиоловых и метионинных остатков, потерей VP4 или фрагментацией РНК в сердцевине. Все эти эффекты можно уменьшить, если собирать урожай вируса сразу после того, как его титр достигнет максимума (см., например, рис. 18.7), и производить очистку при нейтральном рН и низкой температуре. Чтобы минимизировать окисление или замещение реакционноспособных боковых групп



Рис. 18.5. Бляшки риновируса человека типа 14 на газоне клеток HeLa. Примерно 15 000 вирусных частиц в 0.2 мл буферного раствора наносили на монослой (4 млн. клеток), выращенный на дне чашки. Через определенный промежуток времени неадсорбированный вирус смывали и клетки покрывали питательным агаром, образующим гель. Гель предотвращает конвекцию, но не препятствует диффузии вируса от каждой единичной клетки к ее соседям. Таким образом, вирус создает островки убитых клеток (бляшки). Когда бляшки вырастают до подходящего размера, агаровое покрытие удаляют, и слой клеток, остающихся на дне чашки, окрашивают спиртовым раствором красителя кристаллического фиолетового. Наличие непрокрашенных зон в клеточном монослое обусловлено отделением убитых вирусом клеток от стекла после удаления агарового покрытия. Каждая из 73 бляшек на этом рисунке считается одной бляшкообразующей единицей (БОЕ). В данном опыте число вирусных частиц, соответствующих одной бляшкообразующей единице, равно $15\,000/73 \approx 200$. Различия в размерах бляшек могут быть связаны с присутствием мутантов в инокуляте или с различиями в скоростях, с которыми индивидуальные частицы инициируют инфекцию (присоединяются к клетке, проникают в нее и размножаются) [135]. Чтобы проверить, какое из объяснений правильно, обычно берут вирус из дисков агарового покрытия, взятых над обособленно расположенными бляшками, и вновь высевает его для получения бляшек.

(цистеина, метионина, тирозина, триптофана), в буферные растворы для очистки можно добавлять защитные тиолы, например меркаптоэтанол или дитиотрейтол. Так, инфекционность вирусов ЕСНО очень сильно меняется под действием реагентов, замещающих сульфгидрильные группы [245]. Тем не менее, вероятно, основной причиной уменьшения инфекционности являются сбои в ходе инфекционного цикла [147].

Структура протомера

Приняв 60-протомерную модель капсида, рассмотрим теперь структурную организацию и функции четырех цепей в пикорна-вирусной субъединице.

Функции протомера

Белок оболочки выполняет по крайней мере четыре важные функции. 1. Защищает геномную РНК от нуклеаз, присутствующих в окружающей среде. 2. Узнает специфические клеточные рецепторы на плазматической мембране, являясь, таким образом, важным определяющим фактором клеточной и тканевой тропности (патогенеза). 3. Протомер обладает способностью находить и упаковывать вирусный геном и, возможно, содержит протеазу, участвующую в созревании вириона (см. разд. «Морфогенез»). 4. Наконец, капсид служит эффективным устройством для проникновения геномной РНК через плазматическую мембрану и доставки ее в цитоплазму клетки-хозяина.

Расположение четырех сегментов

Некоторые структурные особенности протомера уже установлены. Так, ясно, что часть белков VP1, VP2 и VP3 располагается на поверхности вириона, где они могут связываться с антителами [76, 182, 306] или другими реагентами [175]. В то же время VP4 защищен от химического замещения, при котором меняются остатки тирозина [146] или лизина [313], и, таким образом, вероятно, лежит внутри вирусной частицы. Более того, при УФ-облучении происходит сшивание с РНК в основном именно белка VP4 [214, 314], что свидетельствует о его тесном контакте с РНК.

VP1 как антирецептор и главный поверхностный антиген

Белок VP1 находится в центре внимания исследователей со времени появления пионерской работы, выполненной на вирусе ящура, которая показала, что он является не только главным антигенным участком, но и рецепторным локусом [316]. В этой и последующих работах [47] было установлено, что трипсин избирательно расщепляет VP1 без существенной потери белка из частицы. Более того, модифицированные трипсином частицы не только не могут прикрепляться к клетке-мишени, но и теряют свою активность в качестве убитой вакцины, т. е. не способны стимулировать образование нейтрализующих антител. Недавние, еще незавершенные работы с выделенным белком

вируса ящура и с синтетическими пептидами свидетельствуют о том, что главный антигенный участок расположен в районе аминокислотных остатков со 141-го по 160-й, а минорный — с 200-го по 213-й [12, 266, 293].

Серотип

Одна из основных особенностей пикорнавирусов состоит в обилии серотипов; сейчас их насчитывается более 231, и это число продолжает расти (табл. 18.1). Серотип определяется по способности моноспецифической антисыворотки нейтрализовать инфекционность вируса [212]. Например, изолят полиовируса идентифицируется как тип 1, если его инфекционность снижается в некоторое условно принятое число раз (например, в 100) после обработки стандартной антисывороткой, полученной против прототипного полиовируса, определенного как тип 1. Другой серотип определяется по неспособности другого генетически чистого вируса нейтрализоваться этой стандартной антисывороткой и неспособности антисыворотки, полученной против этого другого вируса, нейтрализовать первый серотип.

Локализация антигенных участков

Идентификация антигенных детерминант на поверхности вириона важна для изучения механизма нейтрализации. Она служит фундаментом для понимания молекулярных основ серотипирования, а также для создания субъединичных вакцин. Исследование мутантов, устойчивых к нейтрализации моноклональными антителами, показывает, что в случае полиовируса типа 3 основной антигенный участок находится в районе аминокислотных остатков 93—100 [215, 283]. Связывание нейтрализующих моноклональных антител с синтетическими пептидами, отвечающими областям, специфичным для полиовируса типа 1 [303], свидетельствует о том, что участок связывания находится в районе аминокислотных остатков 93—100 в молекуле белка VP1, и указывает на наличие дополнительных участков связывания: в положениях 11—17 и 70—75 VP1, в положении 162—173 VP2 и в положении 71—82 VP3 [91].

Нейтрализация

Предложены три разных механизма нейтрализации. Один из них основан на полимеризации, второй — на конформационных изменениях и третий — на соединении пентамеров в вирионе. При наличии нейтрализующих антител в антисыворотке изоэлектрическая точка полиовируса изменяется от 7 до 4; это

свидетельствует о том, что нейтрализация обусловливается индуцированным антителами изменением конфигурации поверхности вирионов [191]. Сообщалось, что нейтрализующие моноклональные антитела ведут себя сходным образом, а не нейтрализующие не изменяют изоэлектрическую точку [91]. Определяющим фактором процесса нейтрализации может быть соединение пентамеров — основной единицы, участвующей в сборке и диссоциации капсида [141]. Важной причиной снижения инфекционности может служить также полимеризация вирионов с образованием крупных агрегатов [26, 141].

Локализация связывающих доменов

Предположение о том, что VP1 и VP3 содержат домены, связывающие протомеры, было высказано исходя из данных о сохранении белковой оболочки после удаления из нее VP2 и VP4 при щелочной обработке [152]. VP4 часто теряется при повреждении капсида или перед освобождением РНК из вириона. Этот белок является продуктом расщепления белка-предшественника VP0 в процессе созревания вирусной частицы. Все эти свойства предполагают, что VP4-домен VP0 участвует во взаимодействии РНК — белок, необходимом для специфической упаковки вирусного генома.

Перспективные направления

Одним из неожиданных результатов, полученных в ходе использования моноклональных антител, оказалось обнаружение небольшого числа главных антигенных детерминант, на долю которых приходится лишь несколько процентов от всего количества аминокислот вирусной оболочки. Отсюда следует, что из многих теоретически возможных участков поверхности вириона только один или несколько являются главными антигенами. Таким образом, большая часть поверхности либо неантигенна, либо слабоантигенна. Возможно, высокоиммуногенные детерминанты представляют собой гибкие выступы, способные легко связываться с поверхностью иммунокомпетентной клетки.

Рентгеноструктурный анализ [9, 127] несомненно позволит выяснить, какие именно поверхностные структуры ответственны за наличие большого числа серотипов. Если нам удастся более четко установить строение нейтрализующих детерминант, мы сможем выработать новые стратегии создания вакцин, основанные, например, на использовании синтетических пептидов. Одинаково ли расположение антирецепторов у вирусов, принадлежащих к разным рецепторным группам? Как связаны антирецепторы с поверхностными антигенами? Каковы их эволюци-

онные взаимоотношения? Это лишь несколько наиболее перспективных направлений; в них удастся достичь успехов после того, как мы сможем определить аминокислотные последовательности белков путем быстрого секвенирования генома [224], исследовать с помощью моноклональных антител антигенные детерминанты и определить трехмерную структуру протомера таким мощным методом, как рентгеновская дифракция [9, 127].

Цикл размножения

Заражение начинается с присоединения вириона к специфическим рецепторам на плазматической мембране (рис. 18.6). С помощью этих рецепторов осуществляется перенос вирусного генома в цитоплазму в ходе мало изученного процесса, включающего потерю VP4 и освобождение вирусной РНК из белковой оболочки (этап 1).

Используя рибосомы и другие компоненты белоксинтезирующего аппарата клетки-хозяина, проникающая в клетку РНК образует полисомы (этап 2) и направляет синтез «полипротеина». Последний расщепляется протеолитически еще до окончания своего синтеза, в результате чего образуются предшественник белков оболочки (P1), белок центральной части генома (P2) и

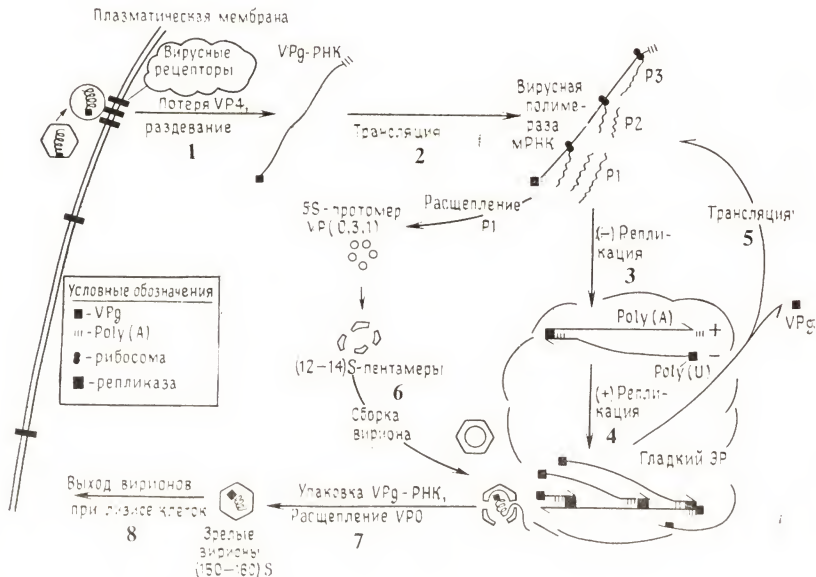


Рис. 18.6. Инфекционный цикл пикорнавирусов.

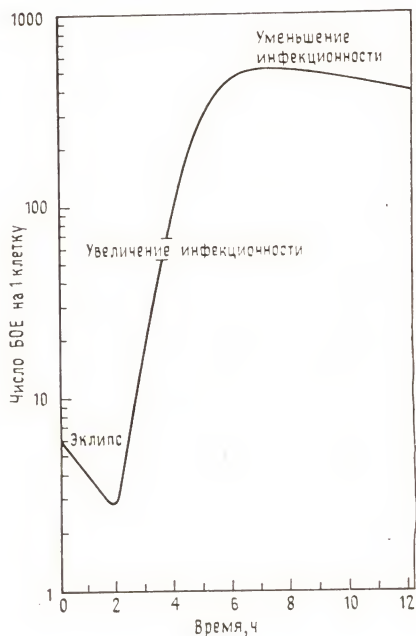
белок правой части генома (РЗ). Последний расщепляется автокаталитически [235] на три белка меньшего размера. Продуктами этого расщепления являются а) протеаза, необходимая для расщепления вирусных белков; б) белок, который дает начало VPg и, вероятно, необходим для инициации синтеза вирусной РНК; в) РНК-полимераза, требующаяся для репликации плюс-цепи РНК и образования комплементарной минус-цепи РНК с poly(U) на 5'-конце (этап 3).

В ходе дальнейшего синтеза плюс-РНК образуются многоцепочечные репликативные промежуточные формы (РПФ) с poly(A) на 3'-конце, которая синтезируется на матрице poly(U) РПФ. Последняя связывается с гладким эндоплазматическим ретикуломом (этап 4), и синтезируется все большее количество плюс-РНК, при участии которой затем осуществляется трансляция (этап 5) и синтезируются минус-цепи РНК. По мере увеличения концентрации вирусных белков происходит упаковка плюс-РНК в вирионы (этап 7).

В самом начале этапа сборки оболочки (этап 6) предшественник белка Р1 расщепляется вирус-специфической протеазой с образованием 5S-субъединиц (незрелый протомер), состоящих из трех тесно связанных белков (VP0, VP3 и VP1). 5S-субъединицы объединяются в пентамеры. Для образования 60-субъединичной белковой оболочки, окружающей геномную РНК, нужно 12 таких пентамеров. Инфекционные (150—160) S-вирионы (этап 7) образуются в результате созревания, при котором большинство цепей VP0 расщепляется с образованием «зрелых» четырехцепочечных субъединиц (VP4, VP3, VP2, VP1), характерных для вирионов пикорнавирусов. Полные вирусные частицы, которые в зараженных клетках часто образуют кристаллы, в конце концов высвобождаются из этих клеток в результате разрушения, вызванного инфекцией (этап 8).

Время, необходимое для прохождения полного цикла размножения — от заражения до окончания сборки вируса, — обычно составляет 5—10 ч. Его конкретная величина зависит от таких факторов, как рН, температура, тип вируса и клетки-хозяина, метаболическое состояние клетки и число частиц, заражающих одну клетку [16]. Для некоторых вирусов, например вируса гепатита А, характерна нелитическая инфекция, длящаяся неограниченно долго [253]. Точное значение длительности цикла размножения необходимо определять экспериментально для каждой системы вирус—клетка. Для этого обычно ставят опыт в условиях одиночного цикла размножения вируса, в котором всю популяцию клеток заражают более или менее одновременно путем внесения в культуру количества вирусных частиц, достаточного для заражения каждой клетки (рис. 18.7).

Рис. 18.7. Кривая одиночного цикла размножения риновируса человека типа 14 в суспензионной культуре клеток HeLa. Вводили такое количество вируса, чтобы каждая клетка в культуре ($4 \cdot 10^6$ клеток/мл) оказалась зараженной. После адсорбции клетки осаждали, чтобы удалить неадсорбированный вирус, и затем ресуспендировали в свежей питательной среде, после чего инкубировали суспензию при 35°C . Через определенные промежутки времени отбирали пробы, которые разводили при комнатной температуре в 10 раз 1%-ным раствором додецилсульфата натрия в дистиллированной воде. При этом происходил лизис клеток и высвобождались как свободные, так и связанные с мембранами вирионы. Большинство пикорнавирусов выдерживает обработку этим детергентом. Прежде чем определять инфекционность, лизаты разводили по крайней мере в 1000 раз нейтральным изотоническим солевым раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Большое разведение снимает токсическое действие детергента на монослой клеток, используемый для определения инфекционности методом бляшек. Альбумин играет двойную защитную роль: а) связывает детергент и б) минимизирует потерю сильно разведенного вируса за счет адсорбции на стенках пробирки, пипетки, чашки.



На начальных этапах размножения наблюдается так называемый латентный период, или эклипс-фаза; в это время инфекционность, обнаруживаемая в зараженной культуре, связана с вирусом, который не разделся. Уменьшение инфекционности в этот период отражает освобождение РНК, которая участвует в процессе инфекции, синтезирует белок и РНК, но еще не приступила к сборке новых вирионов. Латентный период длится от 2 до 4 ч; его можно уменьшить, увеличив множественность заражения [16].

Вслед за латентным периодом начинается подъем инфекционности; этот период состоит из экспоненциальной фазы, когда инфекционность возрастает с постоянной скоростью, и фазы снижения скорости прироста инфекционности, которая в конечном итоге достигает максимума или плато. Для пикорнавирусов, растущих в подходящих условиях, типичный выход вирусных частиц на одну зараженную клетку составляет 25 000—100 000. Инфекционность, выражаемая числом бляшкообразую-

ших единиц на одну клетку, на 1—3 порядка ниже в зависимости от отношения числа бляшкообразующих единиц и вирусных частиц. Время высвобождения вируса зависит от системы вирус—клетка. Например, штамм вируса ЕМС, используемый нами, высвобождается из клеток HeLa очень быстро, в то время как полиовирусы типов 1, 2 и 3 остаются связанными с клетками в течение нескольких часов после завершения сборки.

За плато часто следует период снижения инфекционности, особенно у риновирусов и афтовирусов. В это время геном РНК может подвергаться спонтанному расщеплению, оставаясь внутри интактных в остальных отношениях вирусных частиц [75, 107].

Адсорбция вируса на клеточной поверхности, проникновение в клетку и разделение

Измерение скорости адсорбции

Один из способов измерения скорости адсорбции состоит в смешивании клеток и вируса при низкой множественности заражения (МЗ) и определении числа зараженных клеток. Для этого через различные промежутки времени смешивают зараженные клетки с другими чувствительными клетками, образующими индикаторный газон для обнаружения центра инфекции, возникающей от одной зараженной клетки (метод «инфекционных центров»). Если клетки заранее выращены на дне чашки Петри, как это показано на рис. 18.5, скорость адсорбции на монослой можно определить простым удалением избытка вируса через определенные интервалы времени и подсчетом образующихся в последующем бляшек.

Второй способ определения скорости адсорбции, не требующий низкой МЗ, состоит в добавлении вируса к суспензии клеток, отборе аликвот через определенные промежутки времени, осаждении адсорбированного на клетках вируса при помощи низкоскоростного центрифугирования и измерении инфекционности в надосадочной жидкости. Результаты такого опыта показаны на рис. 18.8.

Изменение концентрации неадсорбированного вируса через малый промежуток времени dt определяется уравнением

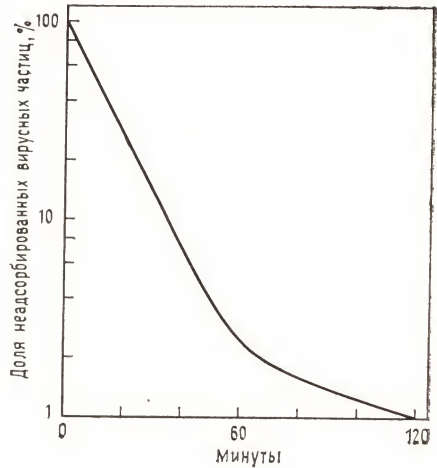
$$dV/dt = -KCV, \quad (1)$$

где V — концентрация неадсорбированного вируса, C — концентрация клеток, K — константа скорости образования комплекса вирус — клетка (VC):



Рис. 18.8. Типичная кривая адсорбции вируса на клетках HeLa в суспензии. Из линейного участка кривой можно рассчитать константу скорости адсорбции K . Например, адсорбция прошла на 90 % через 35 мин; концентрация клеток C была равна $4 \cdot 10^6$ /мл. Используя уравнение (3), получаем:

$$\begin{aligned} K &= 2,3 \log (V_0/V) / Ct = \\ &= 2,3 \log (100/10) / [(4 \cdot 10^6) (35)] = \\ &= 1,6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^3 \cdot \text{мин}^{-1}. \end{aligned}$$



Проинтегрировав уравнение (1) и прологарифмировав обе части равенства, получим

$$\log (V/V_0) = (-KC/2,3)t, \quad (3)$$

где V_0 — начальная концентрация неадсорбированного вируса. Уравнение (3) является уравнением прямой с наклоном $-KC/2,3$ в случае, если соотношение вирусных частиц и клеток не настолько высоко, чтобы произошло насыщение всех участков на поверхности клетки, связывающих вирус (обычно число таких участков равно 10^3 — 10^5). На практике вирусные препараты обычно бывают негомогенными по своим адсорбционным свойствам, и кинетика первого порядка наблюдается до тех пор, пока не адсорбируются 90—99% вирусных частиц.

В случае, представленном на рисунке 18.8, 90% вируса адсорбируется за 35 минут при концентрации $4 \cdot 10^6$ /мл. Из уравнения (1) следует, что при увеличении концентрации клеток в 10 раз должно произойти такое же увеличение скорости адсорбции. Таким образом, увеличив концентрацию клеток до $4 \cdot 10^7$ /мл, можно уменьшить время 90%-ной адсорбции до 3,5 мин. Эта прямая пропорциональность между концентрацией клеток и скоростью адсорбции лежит в основе широко распространенной практики использования высокой концентрации клеток для ускорения адсорбции. Аналогично этому разбавление суспензий представляет собой быстрый и удобный способ остановки адсорбции.

Скорость адсорбции, измеренная представленным на рис. 18.8 способом, определена для разных вирусов и клеток-хозяев. Эти скорости существенно различаются. Например, вирус Коксаки ВЗ, для которого $K=10^{-8}$, адсорбируется на по-

верхности клеток HeLa в 10 000 раз быстрее, чем вирус Коксаки В2 ($K=10^{-12}$) [65]. С другой стороны, все три серотипа полиовируса присоединяются к клеткам HeLa с примерно одинаковой скоростью ($K=2-4 \cdot 10^{-9}$). Некоторые вирусы, например вирус ЕМС, присоединяются к мышинным клеткам и клеткам HeLa настолько быстро ($K=10^{-7}$), что адсорбция лимитируется лишь диффузией [198].

Электростатическая природа этапа присоединения вируса

При помощи описанных выше методов можно также исследовать влияние температуры, рН и состава растворителя на адсорбцию вируса. Полученные результаты указывают на то, что важную роль в процессе адсорбции играют ионизирующиеся группы на поверхностях вируса и клетки. Например, адсорбция вирусов Коксаки группы В и вируса ЕСНО-6 сильно зависит от рН, причем для каждого вируса характерен свой тип зависимости [65]; с другой стороны, адсорбция полиовирусов почти не меняется в диапазоне рН от 4,5 до 8,5.

Дополнительные указания на то, что начальные этапы присоединения вирионов к клетке определяются электростатическими эффектами, дают опыты по изучению влияния типа ионов на адсорбцию. Например, скорость адсорбции полиовируса значительно увеличивается в присутствии моновалентных ионов [132]. Некоторые пикорнавирусы адсорбируются лишь при наличии двухвалентных ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} . Сюда относятся риновирусы [28, 179], вирусы Коксаки А9 [203] и А13 [56] и вирус ящура [29]. Хелатирующий агент ЭДТА подавляет адсорбцию вирусов, происходящую в присутствии двухвалентных катионов [177]. Таким образом, электростатическое притяжение играет ключевую роль в обеспечении адсорбции вирусных частиц. Однако неясно, являются ли ионы лишь солевыми мостиками или играют более стереоспецифическую роль, например ориентируя вирусные частицы относительно рецепторов посредством комплементарного распределения зарядов.

Детерминанты сродства вирусов к определенным клеткам

Для вирусных инфекций характерны избирательность по отношению к хозяевам и специфический набор симптомов (синдром). Например, полиовирус и риновирусы человека вызывают вполне определенные заболевания у людей, а афтовирусы явля-

ются возбудителями заболеваний у парнокопытных. Симптомы заболевания часто бывают связаны с поражением определенных тканей. Например, у человека полиовирус поражает клетки носоглотки и пищевода; именно здесь этот вирус размножается в природных условиях. Паралитическая форма полиовируса имеет высокое сродство к клеткам передних рогов спинного мозга; этим и определяются характерные паралитические проявления болезни. Сходный тип специфичности наблюдается и у вирусов Коксаки, которые, подобно полиовирусу, заражают клетки носоглотки, однако в отличие от него имеют сродство к скелетным и сердечной мышцам. Кроме того, вирусы Коксаки могут заражать новорожденных мышей.

Механизмы, ответственные за сродство вирусов к определенным клеткам, поняты не до конца. Имеются многочисленные сообщения об «абортивных» или «ограниченных» инфекциях, при которых геномная РНК раздевается и запускает инфекционный процесс, но последний прерывается на каком-то критическом этапе репликативного цикла [81, 137, 252, 284]. Это означает, что для размножения вируса необходимы специфические клеточные элементы. Возможно, это хозяйская протеаза, нужная для процессинга вирусных белков [121], или какой-то фактор, принимающий участие в синтезе вирусной РНК [74].

Другая хорошо обоснованная гипотеза сродства основана на предположении о том, что клетки несут на своей поверхности специфические рецепторные молекулы, необходимые для проникновения вируса. Эта гипотеза была сформулирована, исходя из данных о том, что амнион и почки человека, в норме не поражающиеся при полиомиелите, становятся высокочувствительными к полиовирусу при выращивании клеток в культуре [151]. Как показали дальнейшие исследования, эта чувствительность коррелирует с появлением на клеточной поверхности участков, называемых рецепторами, которые связывают вирус и маскируют его инфекционность [128, 130, 131, 255]. Способность вируса Коксаки А вызывать миозит только у новорожденных мышей также коррелирует с наличием специфических рецепторов на дифференцирующихся фибробластах, но не на поверхности большинства других клеток эмбриона [203]. Диабет у мышей вызывает вирус ЕМС особой разновидности — ЕМС-D; его отличает сродство к инсулинпродуцирующим островковым клеткам поджелудочной железы [324]. Эти результаты привлекли большой интерес к концепции определяющей роли вирусных рецепторов в развитии заболевания даже несмотря на то, что ранние работы не выявили четкой корреляции между наличием рецепторов и патогенезом паралитического заболевания [123, 163].

Семейства рецепторов

Рецепторы, связывающие полиовирус, разрушаются трипсином и регенерируют через 1—2 ч роста клеток [172]. Актиномицин D (ингибитор синтеза клеточных мРНК) и пуромицин (ингибитор синтеза белка) подавляют регенерацию, а фторфенилаланин, аналог аминокислоты, нет. Таким образом, поверхностные рецепторы непрерывно обновляются, а не просто циркулируют между поверхностью клетки и ее содержимым.

Разные пикорнавирусы используют неодинаковые рецепторы; первым указанием на это послужили данные о разной чувствительности рецепторов к расщепляющим ферментам [325]. Трипсин инактивирует рецепторы для риновирусов, но не для вирусов ЕСНО, вирусов Коксаки группы В или кардиовирусов. Рецепторы для двух последних вирусов разрушаются химотрипсином. Нейраминидаза разрушает рецепторы для кардиовирусов, энтеровирусов крупного рогатого скота, риновирусов лошадей; это указывает на содержание в них сиаловой кислоты [31]. Связывание с клетками вирусов Коксаки группы В и полиовируса [220] специфически подавляют также антиклеточные иммунные сыворотки [10] и антиклеточные моноклональные антитела [42].

Дополнительные данные о наличии нескольких семейств рецепторов получены в опытах по конкурентному связыванию

Таблица 18.9. Репрезентативные семейства рецепторов пикорнавирусов [176]

Вирус, использованный для насыщения рецепторов	Влияние на адсорбцию ¹⁾				
	полиовирусы 1—3	вирус Коксаки А21	вирусы Коксаки В1—6	HRV-2	HRV-14
Полиовирусы 1—3	+	—	—	—	—
Вирус Коксаки А21	—	+	—	—	+
Вирусы Коксаки В1—6	—	—	+	—	—
HRV-2 ²⁾	—	—	—	+	—
HRV-14 ³⁾	—	+	—	—	+

¹⁾ Обычно исследуют присоединение ненасыщающего количества радиоактивно меченного вируса в присутствии избытка немеченых вирионов. Например, избыток полиовируса типа 1 блокирует присоединение полиовирусов типов 1, 2 и 3, но не вирусов Коксаки А21 и В1—6 и риновирусов человека типов 2 и 14.

²⁾ Риновирус человека типа 2 ингибирует также адсорбцию риновирусов человека типов 1А и 1В.

³⁾ Риновирус человека типа 14 ингибирует также адсорбцию риновирусов человека типов 3, 5, 15, 39, 41 и 51.

[18, 64, 176]. Как видно из табл. 18.9, три серотипа полиовируса конкурируют за общий рецептор, отличающийся от рецептора для вирусов Коксаки группы В [66, 255, 256]. Подобно это-

му, существуют отдельные рецепторы для вируса Коксаки А21 и риновирусов человека типов 2 и 14. Более детальные исследования, в которых использовался случайный набор вирусов, представляющих 25 из 89 существующих серотипов, выявили только две группы рецепторов для риновирусов: меньшая группа для серотипов 1А, 1В, 2, 44 и 49 и большая для серотипов 3, 5, 9, 12, 14, 15, 22, 32, 36, 39, 41, 51, 58, 59, 60, 66, 67 и 89 [1]. Только два серотипа, 11 и 17, не удалось связать с какой-либо определенной группой рецепторов.

С другой стороны, неродственные вирусы могут иметь общий рецептор. Например, аденовирус типа 2 конкурирует с вирусами Коксаки В и частично с риновирусом человека типа 2. Таким образом, пикорнавирусы используют набор разных рецепторов, а иногда даже те же рецепторы, что и вирусы неродственных групп. Весьма полезным при классификации групп рецепторов для пикорнавирусов [42], без сомнения, будет использование моноклональных антител против специфических рецепторов.

Природа рецепторов

Несмотря на некоторые успехи в солиubilизации и исследовании клеточных рецепторов [117, 162], об их структуре и функции в клетке известно немного. Ряд пикорнавирусов вызывает агглютинацию эритроцитов, которые являются богатым источником плазматических мембран. Рецепторы эритроцитов частично охарактеризованы для вирусов Коксаки В3 и ЕСНО-7 [244], а также для вируса ЕМС; в последнем случае рецептор сходен с гликофорином А [31] — главным сиалогликопротеином, пронизывающим мембрану и ответственным за групповые антигены крови системы MN. Но, поскольку эритроциты не играют какой-либо явной роли в патогенезе вирусных инфекций, взаимоотношения этих рецепторов гемагглютиниана с эклиптирующими рецепторами чувствительных клеток пока не ясны.

Анализ клеточных гибридов человек—мышь показывает, что локус полиовирусных рецепторов расположен в 19-й хромосоме человека [58, 213], а локус рецептора для вирусов Коксаки В — в маленькой акроцентрической хромосоме [156]. Присутствие функциональных вирусных рецепторов на одних клетках в организме и отсутствие на других указывает на то, что они экспрессируются на клеточной поверхности в соответствии с программой дифференцировки и роста. Разнообразие рецепторов, используемых различными пикорнавирусами, делает их полезным инструментом для исследования экспрессии рецепторов.

Антирецепторы

Связывание со специфическими рецепторами предполагает наличие на поверхности вириона комплементарных участков, называемых антирецепторами, вероятно по одному на каждую из 60 субъединиц белковой оболочки. Поскольку рецепторы способствуют связыванию вируса с клеткой и в конце концов ее гибели, в норме они должны играть какую-то другую, пока неизвестную роль в жизнедеятельности клетки, не связанную с вирусными функциями. Ясно, что клеточные рецепторы появились не для того, чтобы способствовать вирусу; логично предположить, что именно вирусу приходится непрерывно приспосабливаться к различиям в рецепторных молекулах при переходе от одного типа клеток к другому. Исследования, проведенные на вирусе ящура, свидетельствуют о том, что антирецептор расположен на белке VP1 [19, 28].

Проникновение вируса в клетку и раздевание

События, происходящие на молекулярном уровне с момента присоединения вируса к клетке и до начала трансляции, пока не удастся воспроизвести шаг за шагом, используя очищенный вирус и компоненты клетки. Поэтому мы вынуждены применять непрямые подходы, например электронно-микроскопические исследования [68] или анализ последовательных изменений физико-химических свойств вируса [65, 174]. Например, при инкубации комплекса вирус—клетка при 37 °C вирус становится все труднее извлечь из комплекса при помощи таких воздействий, как понижение pH, введение дезоксихолата натрия, додецилсульфата натрия, 8М мочевины или 6М хлористого лития. С этим постепенным увеличением прочности связывания коррелирует уменьшение чувствительности комплекса вирус—клетка к нейтрализации специфическими антисыворотками [129, 188, 326]; этот процесс, вероятно, связан с проникновением вируса через клеточную мембрану («виropексис», или фагоцитоз), где он становится недоступным для антител.

При выращивании в присутствии акридиновых красителей, например нейтрального красного или акридинового оранжевого, полиовирус становится чувствительным к видимому свету, очевидно, потому, что краситель включается в состав зрелых вирионов [67]. Инфекционность вируса, выращенного в темноте и использованного для заражения клеток, вначале обнаруживает фоточувствительность, а затем фоторезистентность [88, 190, 279, 317]. Этот эффект связывают с раздеванием, поскольку предполагается, что высвобождение нуклеиновой кислоты из вириона сопровождается ее освобождением от красителя.

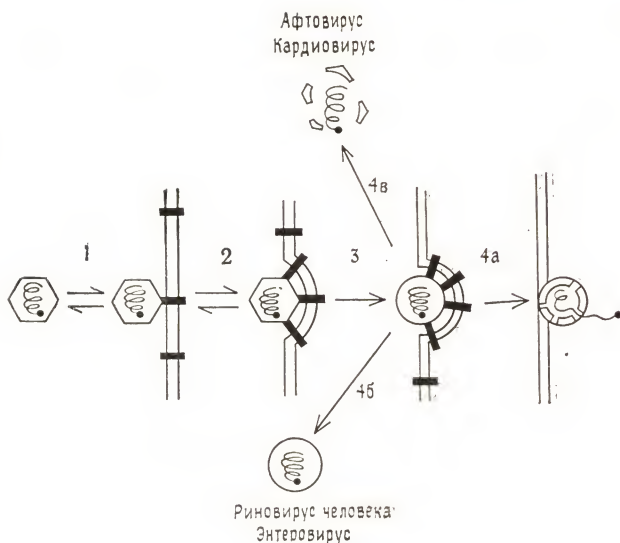


Рис. 18.9. Присоединение вирусной частицы к клетке, сбрасывание защитной белковой оболочки и доставка РНК к месту начала процесса трансляции [25]. 1. Непрочное обратимое связывание антирецептора на поверхности вириона с единичным рецептором, расположенным на поверхности клетки и плавающим в жидкой плазматической мембране. 2. Более прочное связывание с участием все большего числа подвижных рецепторов; этот процесс приводит к «заворачиванию» клеточной мембраны вокруг вирусной частицы, т. е. к началу процесса инвагинации. 3. Конформационное изменение белковой оболочки, сопровождающееся появлением чувствительности к протеазам и потерей белка VP4 с образованием А-частиц. 4а. «Проникновение» частицы, доставка геномной РНК в цитоплазму. Этот процесс сопровождается многими abortивными явлениями, например «элюцией», или «сליщиванием» в среду А-частиц в случае полиовируса, вирусов Коксаки, ЕСНО и риновирусов человека (4б); освобождением свободной РНК и (12-14) S-белковых субъединиц в случае кардио- и афтовир'усов, чьи оболочки менее стабильны (4в). Большая часть раздетой РНК разрушается нуклеазами. Небольшая доля инфекционных вирионов обычно остается нераздетой и может быть обнаружена в урожае потомства.

Красители, которые специфически подавляют раздевание (роданин для вируса ЕСНО-12 [87], арилдон для полиовируса [205] и вещество Ro 09-0410 для риновируса человека [223]), являются ценным инструментом для изучения процесса раздевания.

Прочность связывания кардио- и риновирусов человека зависит от температуры, и в отличие от вируса полиомиелита не возрастает в интервале 0—4 °C [178]. Как считают Лонберг-Хольм и др., увеличение прочности связывания при повышении температуры обусловлено постепенным захватыванием вируса рецепторами, латеральная подвижность которых в плазм-

матической мембране увеличивается при повышении температуры (рис. 18.9). В ходе этого процесса адсорбированные на поверхности частицы теряют белок VP4 (А-частицы) и становятся чувствительными к протеазам [77, 117, 131]. В случае афтовирuсов [18, 29, 46] и кардиовирусов [119, 198] А-частицы не обнаруживаются, возможно, потому, что они слишком лабильны. Некоторые вирусы, например полиовирус и вирус Коксаки В3, претерпевают дальнейшие изменения, вероятно, соответствующие потере VP2 (В-частицы; [77, 117, 178, 200]).

Серьезная проблема, которая возникает при интерпретации результатов экспериментов по проникновению и раздвиганию, заключается в том, что доля продуктивно раздвигавшегося вируса обычно не превышает 1% [189]. Таким образом, трудно отличить частицы, которые инициируют инфекцию, от частиц, вовлеченных в побочные процессы (рис. 18.9, этапы 4б и 4в). Примерами последних могут служить «элюированные», или «слущенные», частицы, которые иногда составляют от 50 до 80% всей популяции [95, 119, 147]. В случае полиовируса эти неинфекционные частицы все еще содержат интактную РНК, но более неспособны присоединяться к клеточным рецепторам; они седиментируют со скоростью, составляющей лишь примерно 70% от скорости седиментации вирионов, и более лабильны в CsCl [95, 147].

Воздействие на клетку-хозяина

Сведения о биохимическом влиянии пикорнавирусов на клеточные функции получены в основном при изучении вирусов, хорошо растущих в культурах клеток и оказывающих четко выраженное воздействие на метаболизм макромолекул в зараженной клетке [106]. Так, мы довольно много знаем о влиянии на клетку цитотидных вирусов, например полиовируса, но нам мало что известно о последствиях заражения такими вирусами, как вирус гепатита А, который, видимо, способен вызывать только персистентную инфекцию.

Роль клетки-хозяина

Клетка-мишень обычно служит для вируса источником энергии и предшественников для синтеза вирусных компонентов, а также предоставляет весь аппарат (рибосомы, тРНК, ферменты и т. д.), необходимый для синтеза вирусных белков. На ней расположены рецепторы, необходимые для заражения, от нее вирус получает мембраны для сборки вирионов и по крайней мере один фактор, требующийся для синтеза вирусной РНК. Имея в виду все это, мы можем говорить о пикорнавирусах как

о высокоавтономных вирусах. Они синтезируют ферменты, необходимые для репликации вирусного генома, и не требуют участия ядра, поскольку способны размножаться в цитоплазме безъядерных клеток [63]. Безъядерные клетки чувствительны также к заражению одноцепочечной полиовирусной РНК, но не двухцепочечной РПФ [78]; последняя способна инициировать инфекцию только в клетке, содержащей ядро [22, 217, 251].

Дополнительные данные о независимости пикорнавирусов от синтеза клеточных нуклеиновых кислот получены в опытах по исследованию ингибиторов метаболизма. Ингибиторы синтеза ДНК, такие как 5-бромурацил и 5-фтордезоксифуридин, обычно не подавляют роста полиовируса. Не подавляет его и актиномицин D, который ингибирует синтез клеточных РНК, встраиваясь между основаниями двухцепочечной ДНК. Это вовсе не означает, что указанные вещества никогда не подавляют размножение пикорнавирусов. У некоторых штаммов полиовируса актиномицин D снижает выход инфекционного вируса до величины, составляющей менее 1% от обычного значения [278]. Интересно, что максимальный эффект наблюдается при введении

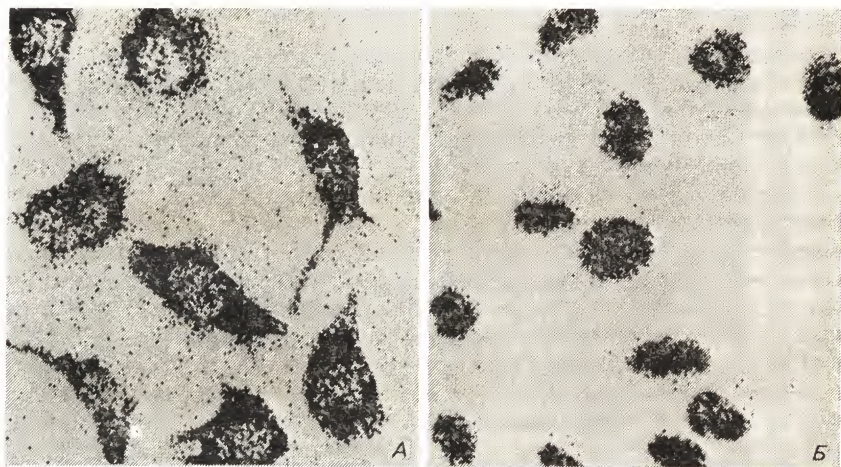


Рис. 18.10. А. Радиоавтограмма ($\times 1090$) мышинных клеток через 5 ч после заражения мышинным кардиовирусом МЕ. К культуре клеток добавляли тритированный уридин и через 5 мин фиксировали клетки кислым спиртом; время включения метки подбирали таким образом, чтобы оно было значительно меньше 30 мин, необходимых для транспорта РНК из ядра в цитоплазму в нормальных клетках. Распределение черных зерен показывает, что зараженные вирусом клетки синтезируют практически всю свою РНК в цитоплазме. Обратите внимание также на то, что при инфекции подавляется синтез ядерной РНК, который наблюдается в незараженных клетках (Б). (Фото приводится с любезного разрешения д-ра Х. Хаузена, Тюбинген, ФРГ.)

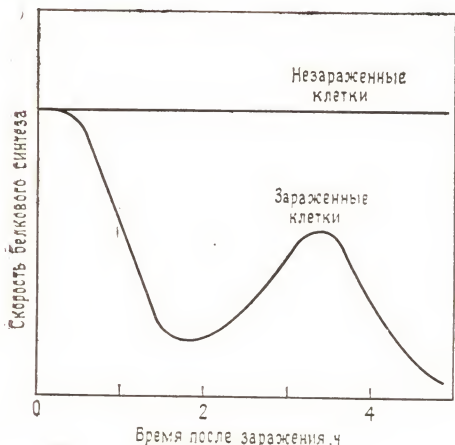


Рис. 18.11. Синтез белков в клетках HeLa, зараженных полиовирусом при высокой множественности. Скорость снижения уровня синтеза, величина и время до новой волны белкового синтеза существенно варьируют у разных вирусов и зависят от множественности заражения и типа клетки-хозяина. Ингибитор актиномицин D, который блокирует синтез клеточных РНК, но не РНК пикорнавируса [258], усиливает снижение клеточного синтеза белка.

актиномицина через 0,5 ч после заражения [111] и снимается обработкой клеток инсулином в течение 24 ч перед заражением [52].

При заражении клетки пикорнавирусом в ней происходят очень сильные изменения метаболизма макромолекул [106]. Сразу после заражения снижается скорость синтеза РНК, при этом в цитоплазме начинается интенсивный синтез вирусной РНК. Способность пикорнавирусов подавлять синтез клеточных РНК в ядре и инициировать синтез вирусных РНК в цитоплазме иллюстрирует рис. 18.10.

Вскоре после заражения подавляется и синтез клеточных белков. В случае клеток HeLa, зараженных полиовирусом (эта система изучена наиболее полно), выключение происходит довольно быстро, в течение примерно 0,5 ч; именно такое время необходимо для присоединения вируса к клетке, проникновения в нее и раздевания (рис. 18.11). Уровень белкового синтеза, за изменением которого следили по включению радиоактивно меченных аминокислот в кислотонерастворимый материал, достигает минимума примерно через 2 ч после заражения. Далее следует волна включения метки, достигающая максимума примерно через 3 ч; она отвечает синтезу исключительно вирусных белков. Окрашивание зараженных клеток флуоресцирующими антителами к белкам капсида выявляет вирусные белки в цитоплазме — сначала вблизи ядра, затем по всей цитоплазме и в скоплениях около плазматической мембраны [124]. Наконец, начинается снижение синтеза вирусных белков, связанное с выходом внутриклеточных компонентов и гибелью клетки.

Цитопатические эффекты

Большинство пикорнавирусов индуцирует характерные морфологические изменения в зараженных клетках. Один из ранних эффектов, появляющихся в течение первого часа после заражения, состоит в маргинации хроматина, при которой ядерный материал теряет свою обычную однородную микроскопическую текстуру и скапливается у внутренней поверхности ядерной оболочки [106]. Сообщалось об изменении гистонного состава хроматина в клетках, зараженных кардиовирусами [134, 304] и афтоввирусами [113].

Примерно через 2,5—3 ч после заражения в цитоплазме появляются мембранные везикулы; они находятся вблизи ядерной оболочки, а затем распространяются к периферии, заполняя всю цитоплазму [69]. Это распространение везикул связано с изменениями проницаемости плазматической мембраны, потерей способности концентрировать прижизненные красители [55], усилением включения холина в клеточные мембраны [4] и затем выходом внутриклеточных компонентов и сморщиванием всей клетки. На поздних стадиях заражения в цитоплазме клетки часто обнаруживаются кристаллы вируса.

Высказывалось предположение, что этот так называемый цитопатический эффект (ЦПЭ), столь характерный для зараженных пикорнавирусами клеток, обусловлен перераспределением лизосомных ферментов, возможно фосфолипазы [259, 319]. Ранее предполагали, что в ЦПЭ участвует двухцепочечная РНК, но эта гипотеза не получила поддержки.

Синтез клеточных РНК, белка и ДНК начинает снижаться в течение первых нескольких часов после заражения. Подавление синтеза макромолекул клетки-хозяина не может полностью объяснить выраженного цитопатического эффекта пикорнавирусной инфекции, и имеются косвенные указания на то, что для полной экспрессии ЦПЭ необходим синтез вирусного белка [11]. Предпринимались попытки связать ЦПЭ с распределением вирусных белков по органеллам клетки-хозяина, но однозначных результатов получить не удалось [21].

Подавление синтеза клеточной РНК

Синтез рибосомных и информационных РНК начинает снижаться вскоре после заражения многими пикорнавирусами, включая полиовирус, вирус менго, вирус ЕМС, риновирусы человека и вирус ящура [181]. Кинетика снижения для разных клеток неодинакова. В мышинных L-клетках, например, вирус менго подавляет синтез рибосомных и информационных РНК до уровня, составляющего менее 10% от обычного в течение

одного часа после заражения [106], а в клетках HeLa, зараженных этим же вирусом, снижение происходит гораздо медленнее [199].

Подавление синтеза ядерной РНК сопровождается снижением способности изолированных ядер или неочищенных ДНК-белковых комплексов из зараженных клеток синтезировать РНК. Исследование транскрипции, чувствительной к α -аманитину, показывает, что сильнее всего подавляется активность РНК-полимеразы II; ингибирование РНК-полимераз I и III менее выражено. Однако после освобождения из нуклеопротеиновых комплексов все эти полимеразы оказываются активными. Недавние исследования показывают, что мишенью является какой-то неидентифицированный фактор, необходимый для работы РНК-полимеразы II [61]. Это подавление снимается ингибиторами белкового синтеза, еще раз указывая на то, что снижение синтеза клеточной РНК опосредуется вирусным белком [14]; однако соответствующий белок пока не идентифицирован.

Подавление синтеза белков клетки-хозяина

Связанное с полиовирусной инфекцией снижение синтеза белков клетки-хозяина [240] сопровождается диссоциацией комплексов рибосом с мРНК. Распад полисом не связан с деградацией молекул хозяйской мРНК, поскольку после выделения из зараженных клеток они сохраняют полную активность в бесклеточной белоксинтезирующей системе [154].

Один из наиболее интересных моментов в вопросе о выключении синтеза белков клетки-хозяина касается механизма подавления синтеза последних без одновременного блокирования синтеза вирусных белков. Ключевую роль здесь сыграло обнаружение того факта, что 5'-конец полиовирусной РНК в отличие от клеточных мРНК не экпирован и заканчивается олигонуклеотидом рUp, а не последовательностью m⁷G(5')ppp(5')N..., как почти у всех других мРНК [96, 125, 226]. Это открытие стимулировало поиски механизмов, обеспечивающих инактивацию экпсвязывающих факторов, которые существенны для инициации трансляции хозяйской мРНК, но не нужны для трансляции полиовирусной РНК.

Недавние исследования на полиовирусах показывают, что подавление обусловлено индуцированной вирусом инактивацией клеточной структуры — экпсвязывающего комплекса (КСК), необходимого для присоединения экпированных мРНК к рибосомам [94]. КСК содержит три белка (р220, р49 и р24/28); его можно очистить с помощью хроматографии, используя способность связываться с аналогами экпа. Один из белков, р220, расщепляется на ранних этапах инфекции; более того, это расщеп-

ление подавляется теми же ингибиторами (N-этилмалеимид, иодацетамид, ионы цинка), которые подавляют процессинг полиовирусных белков, указывая на то, что р220, возможно, расщепляется вирусной протеазой. Вероятно, сходный механизм действует в клетках HeLa, зараженных риновирусом человека типа 4, но не кардиовирусами [181].

Подавление белкового синтеза в мышинных L-клетках, зараженных вирусом ЕМС или вирусом менго, по-видимому, осуществляется с помощью другого механизма, а именно конкуренции между вирусными и клеточными мРНК [145]. В этом случае, вероятно, вирусная РНК по мере накопления все успешнее конкурирует с клеточными мРНК за один или несколько факторов, участвующих в белковом синтезе. Кинетика подавления зависит от типа клеток. Так, быстрое подавление наблюдается в мышинных L-клетках, зараженных кардиовирусами, но не в плазмацитомах, асцитных клетках Кребс-II и асците Эрлиха [145, 229]. Это свидетельствует о том, что подавление синтеза белков клетки-хозяина — случайное свойство жизненного цикла пикорнавирусов, которое предоставляет вирусу селективные преимущества в некоторых биологических ситуациях, но не является необходимым для продуктивной инфекции.

Снижение уровня белкового синтеза коррелирует также с повышением проницаемости мембран L-клеток, зараженных вирусом ЕМС [164], но не клеток HeLa, зараженных полиовирусом, в которых подавление наступает быстрее. Снижение синтеза клеточных белков на поздних стадиях инфекции может определяться и другими факторами, например утечкой АТР [86].

Механизм выключения клеточного синтеза белков связывают иногда с накоплением двухцепочечной РНК, токсическим действием вирусных белков оболочки, увеличением концентрации ионов натрия и снижением концентрации ионов калия в цитоплазме (которые в свою очередь связывают с изменениями в плазматической мембране), инаktivацией факторов, необходимых для инициации синтеза белка, и вытеснением клеточных мРНК вирусной РНК в конкуренции за лимитирующие компоненты белоксинтезирующего аппарата [89, 90]. Каждая из этих гипотез имеет своих сторонников, и в результате вопрос о механизме выключения синтеза белков клетки-хозяина, зараженной пикорнавирусами, принадлежит к числу наиболее противоречивых во всей литературе по пикорнавирусам.

Другие события

Деление клетки прекращается в течение часа после заражения. При этом премитотические клетки прекращают входение в профазу в течение нескольких минут, а клетки, вошедшие в

профазу в момент заражения, продолжают делиться [302]. Синтез ДНК заметно снижается примерно через 4 ч. Вероятно, все эти эффекты обусловлены исключением синтеза белков и РНК [106].

Нейровирулентность

Штаммы полиовируса сильно различаются по вирулентности. Одни из них вызывают тяжелое паралитическое заболевание, тогда как другие, аттенуированные штаммы, можно не опасаясь вводить людям перорально в качестве живых вакцин. Аттенуированными полиовирусами называют штаммы со сниженной нейротропностью в случае приматов. Нейротропность не является свойством типа «все или ничего»; она варьирует в широких пределах для разных приматов. Например, наиболее нейротропные вирусы, такие как исходные штаммы Махони и Брюнхильд, вызывают параличи при введении от одной до 10 культуральных инфекционных (цитопатических) доз в спинной мозг *Macaca cynomolgus*. Вирус обычно считают аттенуированным, если внутримозговое введение 10^6 — 10^8 инфекционных единиц вируса не вызывает параличей у этих животных [275]. Полагают, что мутации, ведущие к аттенуации, накапливаются в течение многих последовательных этапов. Их можно получить экспериментально, пассируя вирус в культуре или в нервных клетках грызунов.

Сейчас появилась надежда, что нам наконец-то удастся установить, какой именно селективный процесс лежит в основе получения высокоаттенуированных вирусов. Так, определение полной последовательности нейровирулентного штамма полиовируса типа 1, Махони [159, 257], и его аттенуированного производного LSc 2ab [277] выявило различие по 60 нуклеотидам в РНК и 20 аминокислотам в белке [227]. Сравнение полиовирусной вакцины Сэбина типа 3 с родительским штаммом Leon/USA/37 выявило только девять замен оснований, две из которых находятся в некодирующей области на 5'-конце РНК [283]. В настоящее время появилась принципиальная возможность провести систематическое сравнение измененных по этим позициям мутантов, получаемых методами генетической инженерии, и таким образом точно определить, какие именно позиции ответственны за переход от нейровирулентности к аттенуации.

Установление точного соответствия между вирулентностью и одним или двумя основаниями может оказаться непростой задачей, поскольку, во-первых, приматы, на которых проводятся необходимые тесты, редки и дороги, во-вторых, нейро-

тропность не является свойством типа «все или ничего» и, в-третьих, пограничные случаи во многом оцениваются субъективно.

Синтез вирусных РНК и белков

Первый этап

Начальные этапы размножения пикорнавирусов нелегко исследовать по двум причинам. Во-первых, доля вирусных частиц, которым удастся успешно вызвать заражение, невелика, обычно менее 1% от количества внесенного вируса. Во-вторых, незначительные количества синтезируемого вирусного материала маскируются интенсивным метаболизмом макромолекул все еще полноценной клетки-хозяина. Поскольку зараженные клетки не содержат всех компонентов, необходимых для репликации вируса, предполагают, что первая задача вируса заключается в трансляции своего генома и в наработке белков, необходимых для репликации его РНК.

Вначале осуществляется трансляция одной большой кодирующей области генома, а затем в результате расщепления новосинтезированного полипротеина образуются белковые продукты (рис. 18.1). Расщепление пар Туг-Gly, которые связывают предшественник оболочки Р1 с Р2-Р3 и 3С'-3D', в полиовирусе, вероятно, выполняется протеазой хозяина [121]. Остальные расщепления в Р2-Р3 происходят по парам Gln-Gly, узнаваемым кодируемой вирусом протеазой 3С^{рго} [159, 231]. Для того чтобы решить проблему расщепления до того, как образуется необходимая для этого протеаза, молекулы пикорнавирусного Р3 выработали способность к автокаталитическому расщеплению 3С^{рго}.

Синтез РНК

Синтез полипротеина в клетке занимает от 10 до 15 мин [36, 239, 297]. Это, вероятно, минимальное время между разведением и началом синтеза вирусной РНК. Синтез осуществляется с помощью белка 3D^{рго1}, который в цитоплазме зараженных клеток прочно связан с матрицей РНК [100, 183] и клеточными мембранами [39].

Исследование бесклеточного синтеза минус-цепей на матрице плюс-РНК показывает, что в этом процессе участвуют по крайней мере три белка: вирусный белок 3С^{рго1}, предшественник VPg и хозяйский фактор (ХФ) — белок с мол. массой 67 000. Считают, что предшественник VPg, пока точно не идентифици-

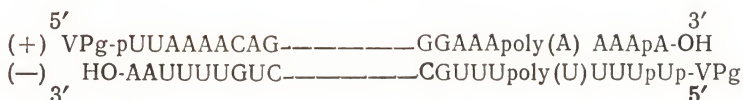


Рис. 18.12. Репликативная форма (РФ) РНК полиовируса. Представлена структура концов комплементарных плюс- и минус-цепей. Последовательности -pApA у 3'-концов каждой цепи — это потенциальные участки распознавания затравкой VPg-pUpU.

рованный, поставляет затравку, например VPg-pUpU, с которой начинается элонгация новой минус-цепи при помощи белка 3D^{pol} [17, 60, 74, 101, 225, 308, 109].

О следующем этапе, на котором на минус-матрицах синтезируются плюс-цепи, известно пока немного. Мы не знаем также, идентичен ли фермент, катализирующий синтез плюс-цепи, ферменту, синтезирующему минус-цепи. В ходе репликации образуется структура, называемая репликативной промежуточной формой (РПФ), которая состоит из полноразмерной матрицы и 6—8 синтезирующихся дочерних цепей [13]. Вероятно, РПФ имеет в основном одноцепочечную структуру [228, 260] с непротяженными участками из спаренных оснований в непосредственной близости от молекул полимеразы (рис. 18.6, этап 4). По оценкам время, необходимое для синтеза каждой молекулы РНК, составляет примерно 45 с [13]. В зараженных клетках обнаруживается также двухцепочечная так называемая репликативная форма (РФ) РНК (рис. 18.12); роль ее в репликации неясна.

Роль мембран в синтезе РНК

Реплицирующиеся формы пикорнавирусных РНК и новосинтезированные вирионы связаны с мембранами гладкого ЭР [37, 39, 167], которые разрастаются по мере репликации вируса [20]. Это разрастание и вакуолизация мембран блокируются гуанидином — ингибитором, подавляющим репликацию вирусной РНК [299].

Кинетика синтеза вирусной РНК

После инициации синтез полиовирусной РНК протекает экспоненциально; образуются все новые и новые матрицы, и скорость синтеза непрерывно увеличивается [16, 171]. На этом раннем этапе она удваивается каждые 15 мин до тех пор, пока не синтезируется примерно 10% от конечного количества продукта. Далее скорость синтеза становится постоянной и, накапливаясь линейно еще в течение часа, число молекул РНК до-

стигает примерно $4 \cdot 10^5$ на клетку. Из них 5—10% составляют минус-цепи [15]. Механизм, обеспечивающий дифференциальный синтез минус- и плюс-цепей, неизвестен. Значительная часть РНК, образованной в течение экспоненциальной фазы, используется в качестве мРНК [16], а примерно 50% РНК, образованной во время линейной фазы синтеза, упаковывается в вирионы [13]. Переход от экспоненциальной фазы к линейной может отражать «перекачку» РНК в вирионный пул.

Роль VPg в регуляции инфекционного цикла

Возможно, VPg тоже участвует в переключении синтеза РНК с экспоненциального на линейный. Среди всех форм полиовирусной РНК в зараженной клетке только РНК, выделенная из полисом (мРНК), не содержит VPg; вместо этого на ее 5'-конце находится последовательность рUpUpA... [96, 125, 226]. Поскольку эта мРНК столь же инфекционна, как и геномная РНК, ясно, что VPg не нужен для инфекционности [102].

В незараженных клетках HeLa обнаруживается активность, которая удаляет VPg с полиовирусной РНК, расщепляя фосфодиэфирную связь между тирозином и 5'-концевым рUp [5, 6]. Роль этого фермента в клетке неясна: клеточные мРНК, несущие белки, сходные с VPg, пока не найдены.

Удаление VPg, очевидно, не сказывается на матричной активности, поскольку геномная РНК, содержащая VPg, активна в качестве мРНК в бесклеточных экстрактах [109], а VPg иногда обнаруживается в полисомах зараженных клеток на поздних стадиях заражения [276]. Несмотря на результаты, полученные *in vitro*, представляется вероятным, что удаление VPg играет важную регуляторную роль в интактных клетках, способствуя переносу мРНК к рибосомам, которые затем связываются с мембранами, образуя участки шероховатого ЭР — место синтеза вирусного белка [265].

Синтез и расщепление полипротеина

Как видно из рисунка 18.11, вслед за вирусиндуцированным снижением синтеза клеточного белка наступает период синтеза исключительно вирусных белков. Впервые это было показано в опытах с добавлением радиоактивно меченных аминокислот к зараженным клеткам и последующим анализом продуктов методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; этот метод позволяет разделить белки по размеру. Таким способом Саммерс, Майзел и Дарнелл [295] обнаружили сложный спектр белков (рис. 18.13) и положили

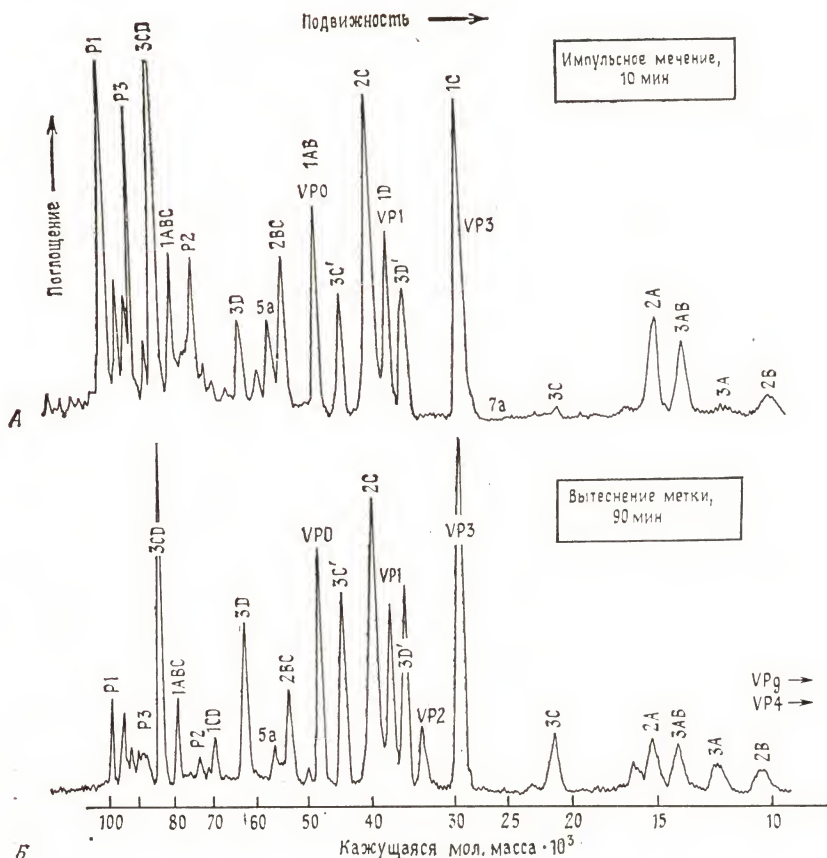


Рис. 18.13. Спектр белков, синтезированных в зараженных полиовирусом клетках HeLa через 3,5 ч после начала инфекции [231, 272]. Клетки растворяли в детергенте додецилсульфате натрия, и белки лизата разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии того же детергента. Белки перемещались по направлению к положительному электроду. Метод позволяет разделять белки по размеру; крупные белки располагаются слева, мелкие — справа. А. Инкубация клеток с радиоактивным [^{35}S]-метионином в течение 10 мин. Б. То же, что и на рис. А, но клетки дополнительно инкубировали в течение 90 мин в среде, не содержащей радиоактивной метки, для того чтобы произошло расщепление меченых белков [231, 272].

начало исследованию синтеза и расщепления белков, кодируемых вирусом.

Картирование этих белков на геноме пикорнавирусов оказалось трудной задачей; для ее решения понадобилось 19 лет и пришлось применить разнообразные методы. К счастью, в са-

мом начале обнаружилось, что все белки происходят из одного полипротеина. Это позволило установить порядок генов, измерив удельную активность вирусных белков, синтезированных в присутствии ингибитора пактамина [36, 294, 297]. Этот ингибитор подавляет инициацию синтеза новых полипептидных цепей, не препятствуя в то же время завершению синтеза на полисомах. Таким образом, когда к клеткам с полисомами, блокированными пактамином, добавляют радиоактивную метку, белки, кодируемые 5'-концевым участком, включают меньше метки, чем белки, кодируемые 3'-концом. Порядок белков затем можно установить по градиенту удельной активности, которая увеличивается в направлении трансляции, от 5'- к 3'-концу.

Сравнение картин распределения белковых фрагментов, полученных в результате расщепления трипсином или цианогенбромидом, и анализ перераспределения радиоактивности между белками в ходе синтеза позволили установить взаимосвязь между предшественником и продуктами [34—36]. При помощи триптического анализа VPg вначале был картирован в белке 3AB_{VPg} [230], а затем при помощи радиохимического секвенирования было показано, что он расположен в правой половине предшественника [159].

По данным анализа концевых групп аминоконцы белков оболочки P1 и 1A блокированы [159, 327]. В результате радиохимического секвенирования полиовирусных белков, которое стало возможным после определения нуклеотидной последовательности генома, была получена такая же карта, как и в ранних исследованиях [272]. Кроме того, было установлено точное расположение сайтов расщепления и показано, что продукты не подвергаются последующему укорачиванию [159, 231].

Лидерный белок L, обнаруженный у афто- и кардиовирусов, но не у энтеро- и риновирусов человека, был впервые идентифицирован при исследовании продуктов бесклеточной трансляции кардиовирусной РНК [43, 166, 290]. Усовершенствование системы из ретикулоцитов кроликов путем предварительной обработки нуклеазой для удаления эндогенных матриц [238] позволило значительно увеличить эффективность бесклеточной трансляции и послужило основой для идентификации [110, 234, 237, 289] вирусной протеазы и картирования ее в 3C^{PRO} [234]. В табл. 18.10 приведен ключ к старой номенклатуре белков некоторых наиболее детально изученных пикорнавирусов.

Морфогенез

Морфогенез пикорнавирусов можно формально рассматривать как последовательный процесс из трех или четырех стадий, в котором мономеры превращаются в пентамеры

Таблица 18.10. Ключ к номенклатуре пикорнавирусных белков

Название L434	Полиовирус		Вирус ящура		HRV-2 [322]	Вирус EMC [270]
	[230]	[159]	[115]	[80]		
L			p16	p16/20		p12/14
L-1-2A						pre-A
1-2A						A
1 (P1)	1a	P1-1a	p91	p88	1A	B
2 (P2)	3b	P2-3b			58	
2BC	5b	P2-5b			X(43)	
2A	8	P2-8	p14	p20c		G
2B	10	P2-10				I
2C	X	P2-X	p41	p34	38	F
2AB	7a	P2-71				
3 (P3)	1b	P3-1b	p102	p100	1B	C
3AB	9	P3-9	p19	p14		H
3C	7c	P3-7c	p118	p20b	7c	p22
3D ¹⁾	4	P3-4b	p16	p46a		E
3D	2	P3-2	p18	p72	2	D
1A	VP4	VP4	VP4	VP4	VP4	Альфа
1B	VP2	VP2	VP2	VP2	VP2	Бета
1C	VP3	VP3	VP3	VP3	VP3	Гамма
1D	VP1	VP1	VP1 ²⁾	VP1	VP1	Дельта
1AB	VP0	VP0	VP0	VP0	VP0	Эпсилон

¹⁾ Известен также как NCVP4, p63, pol(U)-полимераза, репликаза и РНК-полимераза.

²⁾ Ранее обозначался VP3 [12].

(рис. 18.14, этап 1). Затем пентамеры собираются в провирион, состоящий из геномной РНК, находящейся внутри 12-пентамерного капсида (этап 2). Когда происходит упаковка РНК — в ходе сборки капсида (этап 2а) или после него (этап 2г) — неизвестно. Заключительный этап, на котором образуется зрелый вирион (этап 3), включает расщепление большинства (но не всех) молекул VP0 в 60-субъединичном капсиде.

Сборку капсида можно рассматривать исходя из представления о латентных доменах, входящих в состав белковой субъединицы (протомера). Последовательная активация этих латентных доменов, включающих две межсубъединичные связи, домен узнавания РНК и центр расщепления, может происходить в результате изменения конфигурации после каждого промежуточного шага [270, 272]. Экспериментальное подтверждение этому можно получить с помощью серологических исследований. Структурную основу этих изменений только начинают изучать с помощью моноклональных антител [264].

Пикорнавирусы являются весьма удобной моделью для изучения механизмов сборки вирусов, поскольку их 60-субъединичная оболочка относительно проста и состоит всего из 12 блоков

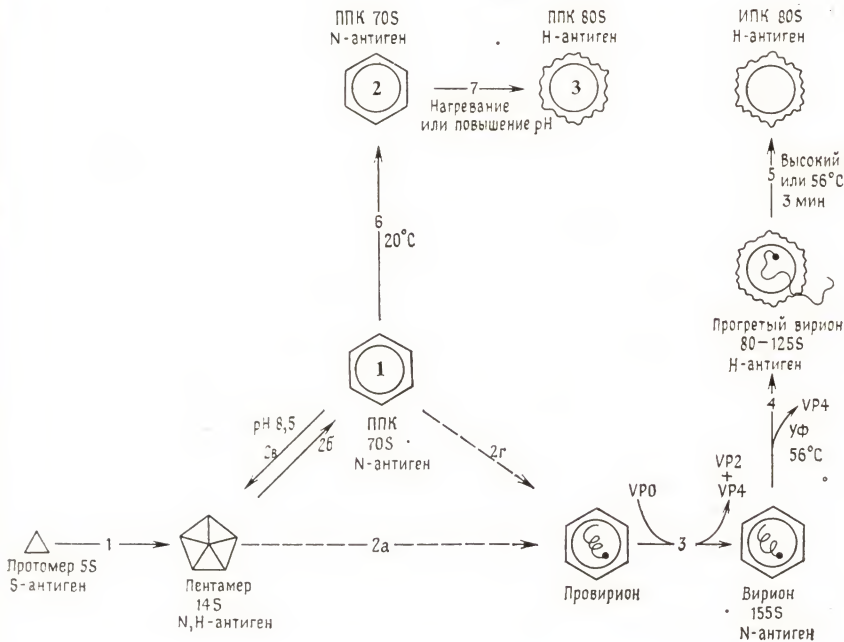


Рис. 18.14. Морфогенез пикорнавирусов. Показаны пути морфогенеза, соответствующие антигены и побочные продукты. Обратите внимание на изменение антигенности (S→N, H→N) по мере прохождения этапов от мономеров до вирионов (путь по горизонтали, внизу). Расщепление цепи VP0 с образованием VP2 и VP4 (этап 3) приводит к образованию инфекционных вирионов (N-антигенность). Пунктирными стрелками показаны предполагаемые альтернативные пути.

вирусных белков [271]. Успехи в этом направлении пока невелики [254]; здесь необходимы какие-то новые подходы. Далее мы попытаемся проследить за проблемой от самых ее истоков, т. е. от обнаружения вирусных антигенов до современного состояния дел, которое подытожено на рис. 18.14.

Природные пустые капсиды

В 1957 г. Майер и др. [195], используя зональное скоростное центрифугирование, разделили частично очищенные препараты полиовируса на четыре зоны, обозначив их буквами А, В, С и D. Первые две были связаны с посторонними примесями. Наиболее быстро седиментирующая зона, D, содержала инфекционные вирионные частицы, а зона С — частицы вирионного размера, которые впоследствии были идентифицированы как

оболочки, лишенные РНК, и теперь называются *природными пустыми капсидами* (ППК). Поскольку пустые капсиды седиментируют со скоростью в два раза меньшей, чем вирионы, и имеют меньшую, чем вирионы, плавучую плотность (табл. 18.2), их часто называют также *природным верхним компонентом* (ПВК).

Каждая из «вирусных» зон, С и D, представлена своей полосой преципитации в агаре. Материал зоны D предпочтительно реагирует с сыворотками переболевших людей, а материал зоны С (С-частицы) — с сыворотками больных в острой стадии полиомиелита [262]. С-частицы из непрогретых клеточных экстрактов по серологическим тестам неотличимы от антигена, полученного прогреванием полиовируса [139, 262].

Антигенная трансформация N—H

Когда инфекционные, или «нативные», поливирионы, называемые N-антигенами (или иногда D-антигенами), прогревают в нейтральном солевом растворе в течение 2—3 мин при 56°C, РНК выходит из частиц и белковая оболочка одновременно приобретает новые антигенные свойства, превращаясь в *H-антиген* (от англ. heated — прогретый) (рис. 18.14, этап 4). Между N- и H-комплексами наблюдается слабый иммунный перекрест (либо вовсе не наблюдается) [261, 262]. Так, сыворотка против H-антигена не нейтрализует нативные вирионы и даже не связывается с ними. Прогретье частицы более неспособны адсорбироваться клетками. Иными словами, когда нативные вирионы прогревают, практически все их характерные поверхностные свойства утрачиваются. Пустые оболочки, полученные прогреванием вирионов, также не содержат VP4 [185] и называются *искусственными пустыми частицами* (ИПЧ), или *искусственным верхним компонентом* (ИВК).

Переход антигена из N- в H-состояние может произойти и другим путем, например при облучении УФ-светом, повышении рН, под действием ртутных соединений или фенола, при высушивании [168]. Потеря РНК не является необходимым условием перехода антигена в H-состояние. Так, вирион может перейти в состояние H-антигенности без потери заключенной в нем РНК при менее длительном прогревании при 56°C или УФ-облучении [153, 168, 262]. Доза УФ-света, необходимая для индукции перехода N—H, гораздо выше той, при которой утрачивается инфекционность [153, 262, 315].

Переход антигена из N-состояния в H необратим и происходит кооперативно; это означает, что частица либо полностью N-антигенна, либо полностью H-антигенна. Мозаичные вирионы, содержащие смесь N- и H-детерминант, встречаются очень

редко либо полностью отсутствуют [138, 139]. Это означает, что, начавшись, переход N—H быстро охватывает все соседние субъединицы в частице.

S-антиген

При иммунизации белком 2S, образующимся в результате деградации полиовируса 6M гуанидинхлоридом, получается еще один антиген, называемый S-антигеном. Образующиеся антитела, но не N- и H-специфические антитела, реагируют с 5S-антигеном в экстрактах из зараженных клеток [282], а также с новосинтезированным вирусным белком, связанным с полисомами [281].

Сборка ППК из 14S-субъединиц *in vitro*

Помимо 5S-субъединиц и ППК экстракты из клеток, зараженных полиовирусом, содержат 14S-частицы [246], известные ранее как 10S-частицы [312]. Анализ полипептидного состава показал, что ППК, 14S-частицы, а возможно, и 5S-компонент содержат примерно одинаковые количества VP0, VP1 и VP3 [249], но не содержат две белковые цепи VP2 и VP4, которые обнаруживаются в зрелом вирионе. В этой же работе было показано также, что экстракты из зараженных клеток способны стимулировать сборку 14S-частиц в ППК. Эта активность, стимулирующая сборку *in vitro*, вирус-специфическая, поскольку она полностью отсутствует в экстрактах из незараженных клеток.

Морфопоэтический фактор

Филипс и др. [247, 254] показали, что существуют два типа сборки: самосборка и сборка, стимулируемая экстрактом. Они имеют сходные кинетики, оптимумы pH, концентрации солей, температуры (37°C). Для самосборки необходима высокая концентрация 14S-частиц, а образующиеся частицы обладают H-антигенностью. Сборка, стимулируемая экстрактом, протекает при значительно более низкой концентрации 14S-частиц, и образующиеся частицы N-антигенны. Активность, катализирующая сборку, которая чувствительна к трипсину, но не к рибонуклеазе, локализована в мембранах ШЭР, несущих 14S-частицы, ППК и неидентифицированную 110S-структуру, которая высвобождается при растворении мембран дезоксихолатом [242]. Экстракты из клеток, зараженных дефектными интерферирующими (ДИ) частицами (формой полиовируса, единственным известным дефектом которого является делеция генов бел-

ка оболочки [49]), не содержат активности, стимулирующей сборку [248]. Из всего этого следует, что морфопоэтический фактор, связанный с ШЭР, представляет собой какой-то белок оболочки, связанный с мембранами.

5 S-частицы, синтезированные в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика, способны к самосборке с образованием 14 S-частиц, хотя сборка осуществляется крайне медленно: за 5—18 ч [114, 232] по сравнению с несколькими минутами в зараженных клетках. Способность морфопоэтического фактора ускорять такую сборку пока не исследована.

Роль гладкого эндоплазматического ретикулума

По данным других работ в морфогенезе участвуют репликативные комплексы, которые связаны с гладким, а не с шероховатым ЭР. Наиболее веским аргументом является то, что вирусные частицы, связанные с репликативными комплексами из клеток, импульсно меченных радиоактивным уридином, обладают в три—восемь раз большей удельной радиоактивностью, чем вирионы из других фракций [38]. Это означает, что данные вирионы образовались недавно, а следовательно, сформированы в репликативном комплексе. При обработке рибонуклеазой этих репликативных комплексов, связанных с мембранами, можно выделить стабильные пустые оболочки [321].

Образование вирионов и расщепление, приводящее к созреванию

О взаимосвязи между синтезом РНК и образованием вирионов свидетельствуют и результаты опытов с использованием гуанидина. Этот ингибитор специфически блокирует сборку вирионов [120] при концентрации 1—3 мМ, никак не сказываясь на синтезе макромолекул в клетке [299]. Согласно современным представлениям, гуанидин влияет на инициацию синтеза РНК. Когда его добавляют в середине инфекционного цикла, переход новосинтезированных молекул РНК из репликативных комплексов в вирионы сразу блокируется; это сопровождается накоплением пустых оболочек, прекращением расщепления VP0 и перехода радиоактивного белка в вирионы [13].

После удаления ингибитора синтез РНК возобновляется, метка из пустых оболочек быстро и количественно переходит во фракцию вирионов, а белок VP0 расщепляется [142, 143]. В результате этих исследований было показано, что различия в полипептидном составе между капсидом и его предшественниками связаны с расщеплением белка VP0 на VP2 и VP4 на

конечном этапе морфогенеза, когда вирионы становятся инфекционными.

Подтверждением расщепления VP0, приводящего к созреванию вириона, послужило обнаружение частиц, содержащих РНК и названных *провирионами*. Вначале сообщалось, что коэффициент седиментации этих частиц составляет 120 S [97], но затем было показано, что провирион осаждается вместе со зрелым вирионом (155 S) [116]. В этих частицах больше белка VP0, и в отличие от вирионов они диссоциируют при добавлении додецилсульфата натрия, в 3 M растворе CsCl или в 20 mM растворе ЭДТА (агента, связывающего двухвалентные катионы, например, Ca^{2+} или Mg^{2+}).

Структура 5 S- и 14 S-субъединиц

Гипотеза о том, что 14 S-частицы являются пентамерами незрелых 5 S-протомеров (VP0, VP3, VP1) [271], подтверждается результатами измерения их коэффициентов седиментации и стехиометрии полипептидных цепей [201]. 14 S-частицы из клеток HeLa, зараженных вирусом ЕМС, осаждаются на 6% быстрее, чем (VP2, VP3, VP1)-содержащие 13,4 S-пентамеры из зрелых вирионов, в точном соответствии с предсказаниями теории седиментации (табл. 18.7). О том, что 14 S-субъединицы состоят из протомеров, свидетельствует их диссоциация на меньшие субъединицы с коэффициентом седиментации 5 S и соотношением белков VP0, VP3 и VP1 1:1:1, как и следует ожидать для незрелого протомера [201, 202].

Механизм упаковки РНК

Один из наиболее противоречивых аспектов сборки пикорнавирусов касается механизма, с помощью которого РНК упаковывается в вирионы. Вначале высказывалось предположение о существовании быстро устанавливающегося равновесия между оболочкой и субъединицами, но затем было показано, что ППК исключительно стабильны и диссоциируют только при разделении их на полипептидные цепи.

Исходя из всех этих экспериментальных данных, Джекобсон и Балтимор предложили *гипотезу прокапсида*, согласно которой конечным этапом морфогенеза является ассоциация РНК с образовавшейся ранее оболочкой. Рассматривались два возможных механизма этого процесса: а) РНК каким-то образом внедряется в пустую оболочку (*механизм внедрения*); б) РНК наматывается на образующийся прокапсид, укладывается в особые «каналы» и индуцирует изменения в структуре оболочки, которые вовлекают РНК внутрь частицы и инициируют рас-

щепление, ведущее к созреванию. Последняя гипотеза (*гипотеза трансфигурации*), основанная на наличии довольно экзотического процесса, обладает тем важным преимуществом, что она позволяет объяснить значительные различия в поверхностных свойствах Н-антигена прокапсида и N-антигена вириона.

Три типа ППК

В последние годы стали все чаще появляться данные о том, что два основных свойства ППК, которые позволили Джекобсону и Балтимору сформулировать гипотезу прокапсида, а именно их высокая стабильность и Н-антигенность, являются артефактами процедуры, использованной для их выделения из зараженных клеток. Так, нативные ППК, вероятно, имеют антигенность N, а не Н [140, 219, 264]. Если экстракция проводится при обычных условиях, т. е. при комнатной температуре, нейтральном pH, низкой ионной силе, то для ППК характерна Н-антигенность или антигенность, промежуточная между Н и N. Однако в случае экстракции при pH от 6 до 6,5 и низкой температуре (4°C) наблюдается исключительно N-антигенность, а коэффициент седиментации ППК составляет 70 S (ППК-2 на рис. 18.14). При инкубации при 37°C эти N-антигенные частицы необратимо превращаются в Н-антигенную форму с коэффициентом седиментации 80 S (ППК-3).

Обнаружены также диссоциирующие формы ППК (лабильные ППК, или ППК-1) [193]. Показано, что ППК, выделенные при низкой температуре, легко диссоциируют на 14 S-субъединицы. Эти субъединицы могут объединяться с образованием ППК даже при очень низких концентрациях и без помощи морфогенетических мембран. Тем не менее когда лабильные ППК выдерживают в течение непродолжительного времени при комнатной температуре, они становятся недиссоциирующими (стабильными), ППК-2 или ППК-3 в зависимости от степени повреждающего воздействия.

Заключение

Центральной проблемой морфогенеза пикорнавирусов остается механизм упаковки РНК. Данные о том, что ППК обладает N-антигенностью, ставят под сомнение гипотезу трансфигурации, а обнаружение обратимости диссоциации ППК вновь возвращает нас к мысли о том, что эти оболочки являются просто резервуарами для хранения 14 S-субъединиц.

Тем не менее гипотезу прокапсида нельзя окончательно отвергнуть. Пока четко не показано, что ППК содержат полный набор из 60 субъединиц, можно предположить, что в них недо-

стает одного или двух пентамеров [170] и таким образом имеет отверстие, через которое РНК проникает внутрь частицы. Включение последнего пентамера может запускать расщепление, ведущее к созреванию.

Другими возможностями являются упаковка 53 S-полуоболочек [170] и сборка 14 S-пентамеров вокруг конденсированной РНК [108]. Обе эти модели ставят нетривиальный вопрос: каким образом РНК конденсируется в шар, который достаточно плотен для того, чтобы поместиться в центральную полость частицы, и в котором концентрация РНК составляет 50—70%.

Имеющиеся данные о быстром прекращении упаковки РНК после добавления гуанидина [12] и обнаружение новосинтезированных вирионов в репликативных комплексах, связанных с гладким ЭР [38, 321], свидетельствуют о связи между синтезом и упаковкой РНК. Можно предположить, что при синтезе создается та движущая сила, которая необходима для внедрения РНК в прокапсид или для конденсации ее в компактное ядро. Возможно, для выяснения природы заключительных этапов упаковки геномной РНК понадобится создать бесклеточные системы, способные к синтезу репликативных промежуточных форм РНК. Разрешение проблемы упаковки геномной РНК стимулирует исследование других процессов упаковки в биологических системах.

Литература

1. Abraham G., Colonna R. J. (1984). Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor, *J. Virol.*, 51, 340—345.
2. Ahlquist P., Kaesberg K. (1979). Determination of the length distribution of poly(A) at the 3' terminus of the virion RNAs of EMC virus, poliovirus, rhinovirus, RAV-61 and CPMV and of mouse globin mRNA, *Nucleic Acids Res.*, 7, 1195—1204.
3. Alexander H. E., Koch G., Mountain I. M., Sprunt K., Van Damme O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers, *Virology*, 5, 172—173.
4. Amako K., Dales S. (1967). Cytopathology of mengovirus infection. II. Proliferation of membranous cisternae, *Virology*, 32, 201—215.
5. Ambrose V., Baltimore D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5' terminal protein from polioviral RNA, *J. Biol. Chem.*, 255, 6739—6744.
6. Ambrose V., Pettersson R. F., Baltimore D. (1978). An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein, *Cell*, 5, 1439—1446.
7. Anderegg J. W. (1957). X-ray scattering from small RNA viruses in solution. In: *Small-Angle X-Ray Scattering*, ed. by H. Brumberger, pp. 243—265, Gordon and Breach, New York.
8. Anderson-Sillman K., Bartal S., Tershak D. (1984). Guanidine-resistant poliovirus mutants produce modified 37-kilodalton proteins, *J. Virol.*, 50, 922—928.
9. Arnold E., Erickson J. W., Fout G. S., Frankenberger E. A., Hecht H.-J., Luo M., Rossmann M. G., Rueckert R. R. (1984). Virion orientation in cubic

- crystals of the human common cold virus HRV-14, *J. Mol. Biol.*, **177**, 417—430.
10. *Axler D. A., Crowell R. L.* (1968). Effect of anticellular serum on the attachment of enteroviruses to HeLa cells, *J. Virol.*, **2**, 813—821.
 11. *Bablanian R., Eggers H. J., Tamm I.* (1965). Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage. II. The relation between poliovirus growth and virus-induced morphological changes in cells, *Virology*, **26**, 114—121.
 12. *Bachrach H. L., Morgan D. O., McKercher P. D., Moore D. M., Robertson B. H.* (1982). Foot and mouth disease virus: Immunogenicity and structure of fragments derived from capsid protein vp3 and of virus containing cleaved VP3, *Vet. Microbiol.*, **7**, 85—96.
 13. *Baltimore D.* (1969). The replication of picornaviruses. In: *The Biochemistry of Viruses*, ed. by H. B. Levy, pp. 101—176, Marcel Dekker, New York.
 14. *Baltimore D., Franklin R. M., Callender J.* (1963). Mengovirus-induced inhibition of host ribonucleic acid and protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 425—430.
 15. *Baltimore D., Girard M.* (1966). An intermediate in synthesis of poliovirus RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 741—748.
 16. *Baltimore D., Girard M., Darnell J. E.* (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles, *Virology*, **29**, 179—189.
 17. *Baron M. H., Baltimore D.* (1982). Purification and properties of a host cell protein required for poliovirus replication in vitro, *J. Biol. Chem.*, **257**, 12351—12358.
 18. *Baxt B., Bachrach H. L.* (1980). Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells, *Virology*, **104**, 42—55.
 19. *Baxt B., Morgan D. O., Robertson B. H., Timpone C. A.* (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment, *J. Virol.*, **51**, 298—305.
 20. *Bienz K., Egger D., Rasser Y., Bossart W.* (1980). Kinetics and location of poliovirus macromolecular synthesis in correlation to virus-induced cytopathology, *Virology*, **100**, 390—399.
 21. *Bienz K., Egger D., Rasser Y., Bossart W.* (1983). Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures, *Virology*, **131**, 39—48.
 22. *Bishop J. M., Koch G.* (1967). Purification and characterization of poliovirus-induced infectious double-stranded RNA, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1736—1743.
 23. *Black D. N., Stephenson P., Rowlands D. J., Brown F.* (1979). Sequence and location of the poly(C) tract in aphtho- and cardiovirus RNA, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 2381—2390.
 24. *Bodian D., Horstmann D. M.* (1965). Polioviruses. In: *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 4th Ed., ed. by F. Horsfall and I. Tamm, pp. 430—473, Lippincott, Philadelphia.
 25. *Boulanger P., Lonberg-Holm K.* (1981). Components of non-enveloped viruses which recognize receptors. In: *Receptors and Recognition*, Series B, Vol. 8: *Virus Receptors*, Part 2: *Animal Viruses*, ed. by K. Lonberg-Holm and L. Philipson, pp. 21—46, Chapman and Hall, New York.
 26. *Brioen P., Dekegel D., Boeye A.* (1983). Neutralization of poliovirus by antibody-mediated polymerization, *Virology*, **127**, 463—468.
 27. *Brooksby J. B.* (1982). Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus, *Intervirology*, **18**, 1—23.
 28. *Brown F.* (1983). Neutralizing site of poliovirus, *Nature*, **304**, 395.
 29. *Brown F., Cartwright B., Stewart D. L.* (1962). Further studies on the infection of pig-kidney cells by foot-and-mouth disease virus, *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 768—774.
 30. *Brown F., Newman J. F. E., Stott J., Porter A., Frisby D., Newton C., Ca-*

- rey N., Fellner P. (1974). Poly C in animal viral RNAs, *Nature*, **251**, 342—344.
31. Burness A. T. H. (1980). Glycophorin and sialylated components as virus receptors. In: *Receptors and Recognition, Series B, Vol. 8: Virus Receptors. Part 2: Animal Viruses*, ed. by K. Lonberg-Holm and L. Philipson, pp. 63—84, Chapman and Hall, New York.
 32. Burness A. T. H., Clothier F. W. (1970). Particle weight and other biophysical properties of encephalomyocarditis virus, *J. Gen. Virol.*, **6**, 381—393.
 33. Butterworth B. E. (1973). A comparison of the virus-specific polypeptides of encephalomyocarditis virus, human rhinovirus-1A and poliovirus, *Virology*, **56**, 439—453.
 34. Butterworth B. E., Hall L., Stoltzfus C. M., Rueckert R. R. (1971). Virus-specific proteins synthesized in encephalomyocarditis virus-infected HeLa cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 3083—3087.
 35. Butterworth B. E., Rueckert R. R. (1972). Kinetics of synthesis and cleavage of encephalomyocarditis virus-specific polypeptides, *Virology*, **50**, 535—549.
 36. Butterworth B. E., Rueckert R. R. (1972). Gene order of encephalomyocarditis virus as determined by studies with pactamycin, *J. Virol.*, **9**, 823—828.
 37. Butterworth B. E., Shimshick E. J., Yin F. H. (1976). Association of the polioviral RNA complex with phospholipid membranes, *J. Virol.*, **19**, 457—466.
 38. Caligiuri L. A., Mosser A. G. (1971). Protein associated with the poliovirus RNA replication complex, *Virology*, **46**, 375—386.
 39. Caligiuri L. A., Tamm I. (1970). Characterization of poliovirus specific structures associated with cytoplasmic membranes, *Virology*, **42**, 112—122.
 40. Caligiuri L. A., Tamm I. (1973). Guanidine and 2- α -hydroxybenzyl benzimidazole (HBB): Selective inhibitors of picornavirus multiplication. In: *Selective inhibitors of Viral Functions*, ed. by W. Carter, pp. 257—294, CRC Press, Cleveland.
 41. Callahan P. L., Mizutani S., Colonna R. J. (1985). Molecular cloning and complete sequence determination of human rhinovirus type 14 genome RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** (in press).
 42. Campbell B. A., Cords C. E. (1983). Monoclonal antibodies that inhibit attachment of group B coxsackieviruses, *J. Virol.*, **48**, 561—564.
 43. Campbell E. A., Jackson J. R. (1982). Processing of the encephalomyocarditis virus capsid precursor protein studied in rabbit reticulocyte lysates incubated with N-formyl-³⁵S-methionine-tRNA, *J. Virol.*, **45**, 439—441.
 44. Carroll A. R., Rowlands D. J., Clark B. E. (1984). The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2461—2472.
 45. Caspar D. L. D., Klug A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1—24.
 46. Cavanagh D., Rowlands D. J., Brown F. (1978). Early events in the interaction between foot-and-mouth disease virus and primary pig kidney cells, *J. Gen. Virol.*, **41**, 255—264.
 47. Cavanagh D., Sangar D. V., Rowlands D. J., Brown F. (1977). Immunogenic and cell attachment sites of FMDV: Further evidence for the ir location in a single capsid polypeptide, *J. Gen. Virol.*, **35**, 149—158.
 48. Chumakov K. V., Agol V. I. (1976). Poly(C) sequence is located near the 5' and of the encephalomyocarditis virus RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 551—557.
 49. Cole C. N. (1975). Defective interfering (DI) particles of poliovirus, *Prog. Med. Virol.*, **20**, 180—207.
 50. Collins F. D., Roberts W. K. (1972). Mechanism of mengovirus-induced cell injury in L-cells: Use of inhibitors of protein synthesis to dissociate virus-specific events, *J. Virol.*, **10**, 969—978.
 51. Colter J. S., Bird H. H., Brown R. A. (1957). Infectivity of ribonucleic acid

- from Ehrlich ascites tumor cells infected with mengo encephalitis, *Nature*, **179**, 859—860.
52. *Cooper P. D.* (1966). The inhibition of poliovirus growth by actinomycin D and the prevention by pretreatment of the cells with serum or insulin, *Virology*, **28**, 663—678.
 53. *Cooper P. D.* (1977). Genetics of picornavirus. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, Vol. 9, pp. 133—207, Plenum, New York.
 54. *Cooper P. D., Steiner-Pryor S., Scotti P. D., Delong D.* (1974). On the nature of poliovirus genetic recombinants, *J. Gen. Virol.*, **23**, 41—49.
 55. *Cordell-Stewart B., Taylor M. W.* (1971). Effect of double-stranded viral RNA on mammalian cells in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1326—1330.
 56. *Cords C. E., James C. G., McLaren L. C.* (1975). Alteration of capsid proteins of coxsackievirus A13 by low ionic concentration, *J. Virol.*, **15**, 244—252.
 57. *Costa Giomi M. P., Bergman I. E., Scodeller E. A., Auge de Mello P., Gomez I., La Torre J. L.* (1984). Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: Biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths, *J. Virol.*, **51**, 799—805.
 58. *Coullin P., Bouye A., Rebourcet R., van Cong N.* (1976). Permissivity of mouse-man hybrid cell clones to three enteroviruses: Poliovirus 2, coxsackie B3 and echovirus. II. Role of human chromosome F 19. *Pathol Biol.*, **24**, 195—203.
 59. *Coulepis A. G., Locarnini S. A., Westaway E. G., Tannock G. A., Gust I. D.* (1982). Biophysical and biochemical characterization of hepatitis A virus, *Intervirology*, **18**, 107—127.
 60. *Crawford N. M., Baltimore D.* (1983). Genome-linked protein VPg of poliovirus present as VPg and VPg-pUp in poliovirus-infected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7452—7455.
 61. *Crawford N., Fire A., Samuels M., Sharp P. A., Baltimore D.* (1981). Inhibition of transcription factor activity by poliovirus, *Cell*, **27**, 555—561.
 62. *Crick F., Watson J. D.* (1956). Structure of small viruses, *Nature*, **177**, 473—475.
 63. *Crocker T. T., Pfendt E., Spendlove R.* (1964). Provirus: Growth in non-nucleate cytoplasm, *Science*, **145**, 401—403.
 64. *Crowell R. L.* (1966). Specific cell-surface alteration by enteroviruses as selected by viral-attachment interference, *J. Bacteriol.*, **91**, 198—204.
 65. *Crowell R. L., Landau B. J.* (1983). Receptors in the initiation of picornavirus infections. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, Vol. 18, pp. 1—42, Plenum, New York.
 66. *Crowell R. L., Syverton J. T.* (1961). The mammalian cell-virus relationship. VI. Sustained infection of HeLa cells by coxsackie B3 virus and effect on superinfection, *J. Exp. Med.*, **113**, 419—435.
 67. *Growth D., Melnick J. L.* (1962). The incorporation of neutral red and acridine orange into developing poliovirus particles making them photosensitive, *Virology*, **14**, 11—21.
 68. *Dales S.* (1962). An electron microscope study of the early association between two mammalian viruses and their hosts, *J. Cell. Biol.*, **13**, 303—322.
 69. *Dales S., Eggers H. J., Tamm I., Palade G. E.* (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus, *Virology*, **26**, 379—389.
 70. *Darnell J. E.* (1958). Adsorption and maturation of poliovirus in single and multiply infected HeLa cells, *J. Exp. Med.*, **107**, 633—641.
 71. *Darnell J. E., Levintow L.* (1960). Poliovirus protein: Source of amino acids and time course of synthesis, *J. Biol. Chem.*, **235**, 74—77.
 72. *Darnell J. E., Levintow L., Thoren M. M., Hooper J. L.* (1961). The time course of synthesis of poliovirus RNA, *Virology*, **13**, 271—279.

73. Darnell J. E., Sawyer T. K. (1959). Variation in plaque-forming ability among parental and clonal strains of HeLa cells, *Virology*, 8, 223—229.
74. Das Gupta A., Zabel P., Baltimore D. (1980). Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein, *Cell*, 19, 423—429.
75. Denoya C. D., Scodeller E. A., Vasquez C., La Torre J. L. (1978). Foot-and-mouth disease virus. II. Endoribonuclease activity with in purified virions, *Virology*, 89, 67—74.
76. Dernick R., Heukeshoven J., Hilbrig M. (1983). Induction of neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides, *Virology*, 130, 243.
77. DeSena J., Mandell B. (1977). Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characterization of the membrane-modified particle, *Virology*, 78, 554—566.
78. Detjen B. M., Lucas J., Wimmer E. (1978). Poliovirus single-stranded RNA and double-stranded RNA: Differential infectivity in enucleate cells, *J. Virol.*, 27, 582—594.
79. Dick E. C., Chesney P. J. (1981). Rhinoviruses. In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, ed. by R. D. Feigin and J. D. Chenssey, pp. 1167—1186, W. B. Saunders, Philadelphia.
80. Doel T. R., Sangar D. V., Rowlands D. J., Brown F. (1978). A reappraisal of the biochemical map of foot-and-mouth disease virus RNA, *J. Gen. Virol.*, 41, 395—404.
81. Dubois M.-F. (1977). Localization of the restrictive event of EMC virus replication in semi-permissive monkey and monkey-mouse hybrid cells, *J. Gen. Virol.*, 37, 115—125.
82. Dulbecco R., Vogt M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus, *J. Exp. Med.*, 99, 167—182.
83. Dunker A. K., Rueckert R. R. (1969). Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gels, *J. Biol. Chem.*, 224, 5074—5080.
84. Dunker A. K., Rueckert R. R. (1971). Fragments generated by pH dissociation of ME virus and their relation to the structure of the virion, *J. Mol. Biol.*, 58, 217—235.
85. Eagle H. (1955). Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture, *Science*, 122, 501—505.
86. Egberts E., Hackett P., Traub P. (1977). Alteration of the intracellular energetic and ionic conditions by mengovirus infection of Ehrlich ascites tumor cells and its influence on protein synthesis in the midphase of infection, *J. Virol.*, 22, 591—597.
87. Eggers H. J. (1977). Selective inhibition of uncoating of echovirus 12 by rhodanine. A study on early virus-cell interaction, *Virology*, 78, 241—252.
88. Eggers H. J., Bode B., Brown D. T. (1979). Cytoplasmic localization of the uncoating of picornaviruses, *Virology*, 92, 211—218.
89. Ehrenfeld E. (1982). Poliovirus-induced inhibition of host-cell protein synthesis, *Cell*, 28, 435—436.
90. Ehrenfeld E. (1984). Picornavirus inhibition of host cell protein synthesis, *Compr. Virol.* (in press).
91. Emimi E. A., Jameson B. A., Wimmer E. (1983) Identification of multiple neutralization sites on poliovirus type 1 and priming of the immune response with synthetic peptides. In: Modern Approaches to Vaccines, ed. by R. M. Chenock and R. A. Lerner, pp. 65—75, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
92. Enders J. F., Weller T. H., Robbins F. C. (1949). Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, *Science*, 109, 85—87.
93. Erickson J. W., Frankenberger E. A., Rossmann M. G., Fout G. S., Medappa K. C., Rueckert R. R. (1983). Crystallization of a common cold virus, human rhinovirus 14: Isomorphism with poliovirus crystals, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 931—934.

94. Etchinson D., Hansen J., Ehrenfeld E., Ederly I., Sonenberg N., Milburn S., Hershey J. W. B. (1984). Demonstration in vitro that eucaryotic initiation factor 3 is active but that a cap-binding protein complex is inactive in poliovirus-infected HeLa cells, *J. Virol.*, **51**, 832—837.
95. Fenwick M. L., Cooper P. D. (1962). Early interactions between poliovirus and ERK cells. Some observations on the nature and significance of the rejected particles, *Virology*, **18**, 212—223.
96. Fernandez-Munoz R., Darnell J. (1976). Structural differences between the 5'-termini of viral and cellular mRNA in poliovirus infected cells: Possible basis for the inhibition of host protein synthesis, *J. Virol.*, **18**, 719—726.
97. Fernandez-Tomas C. B., Baltimore D. (1973). Morphogenesis of poliovirus: II. Demonstration of a new intermediate, the provirion, *J. Virol.*, **12**, 1122.
98. Fiala M., Kenny G. E. (1967). Effect of magnesium on replication of rhinovirus HGP, *J. Virol.*, **1**, 489—493.
99. Finch J. T., Klug A. (1959). Structure of poliomyelitis virus, *Nature*, **182**, 1709—1714.
100. Flanagan J. B., Baltimore D. (1977). Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2677—2680.
101. Flanagan J. B., Baltimore D. (1979). Poliovirus polyuridylic acid polymerase and RNA replicase have the same viral polypeptide, *J. Virol.*, **29**, 352—360.
102. Flanagan J. B., Pettersson R. F., Ambros V., Hewlett M. J., Baltimore D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5' terminus of the virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 961—965.
103. Forss S., Schaller H. (1982). A tandem repeat gene in a picornavirus, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6441—6450.
104. Forss S., Strebel K., Beck E., Schaller H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6587—6603.
105. Fout G. S., Medapp K. C., Mapoles J. E., Rueckert R. R. (1984). Radiochemical determination of polyamines in poliovirus and human rhinovirus 14, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3639—3643.
106. Franklin R. M., Baltimore D. (1962). Patterns of macromolecular synthesis in normal and virus-infected mammalian cells, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 175—194.
107. Gauntt C., Griffith M. M. (1974). Fragmentation of RNA in virus particles of rhinovirus type 14, *J. Gen. Virol.*, **21**, 253—267.
108. Ghendon Y., Yakobson E., Mikhejva A. (1972). Study of some stages of poliovirus morphogenesis in MiO cells, *J. Virol.*, **10**, 261—266.
109. Golini F., Semler B. L., Dorner A. J., Wimmer E. (1980). Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation in vitro, *Nature*, **287**, 600—603.
110. Gorbalenya A. E., Svitkin Y. V., Kazachkov Y. A., Agol V. E. (1979). Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 is involved in the processing of the viral precursor polypeptides, *FEBS Lett.*, **108**, 1—5.
111. Grado C., Fisher S., Contreras G. (1965). The inhibition by actinomycin D of poliovirus multiplication in Hep 2 cells, *Virology*, **27**, 623—625.
112. Graves J. H. (1973). Serological relationship of swine vesicular disease virus and coxsackie B5 virus, *Nature*, **245**, 314—315.
113. Grigera P. R., Tisminetsky S. G. (1984). Histone H3 modification in BHK cells infected with foot-and-mouth disease virus, *Virology*, **136**, 10—19.
114. Grubman M. (1984). In vitro morphogenesis of foot-and-mouth disease virus, *J. Virol.*, **49**, 760—765.
115. Grubman M. J., Robertson B. H., Morgan D. O., Moore D. M., Downen D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus, *J. Virol.*, **50**, 579—586.

116. Guttman N., Baltimore D. (1977). Morphogenesis of poliovirus. IV. Existence of particles sedimenting at 150S and having the properties of proviron, *J. Virol.*, **23**, 363—367.
117. Guttman N., Baltimore D. (1977). A plasma membrane component able to bind and alter virions of poliovirus type 1: Studies on cell-free alteration using a simplified assay, *Virology*, **82**, 25—36.
118. Gwaltney J. M. (1982). Rhinoviruses. In: *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, ed. by A. S. Evans, pp. 491—517, Plenum New York.
119. Hall L., Rueckert R. (1971). Infection of mouse fibroblasts by cardioviruses. Premature uncoating and its prevention by elevated pH and magnesium chloride, *Virology*, **43**, 152—165.
120. Halperen S., Eggers H. J., Tamm I. (1964). Evidence for uncoupled synthesis of viral RNA and viral capsids, *Virology*, **24**, 36—46.
121. Hanecak R., Semler B. L., Anderson C. W., Wimmer E. (1982). Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: Antibodies to a polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3973—3977.
122. Harris T. J. R., Brown F. (1976). The location of the poly(C) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus, *J. Gen. Virol.*, **33**, 493—501.
123. Harter D. H., Choppin P. W. (1965). Adsorption of attenuated and neurovirulent poliovirus strains to central nervous system tissues of primates, *J. Immunol.*, **95**, 730—736.
124. Hausen H. (1962). Cytologische Studien über die Vermehrung des ME-Virus in L-Zellen, *Z. Naturforsch.*, **17b**, 158—160.
125. Hewlett M. J., Rose J. K., Baltimore D. (1976). 5' Terminal structure of poliovirus polyribosomal RNA is pUp, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **73**, 327—330.
126. Hirst G. (1962). Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus and influenza, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 303—309.
127. Hogle J. M. (1982). Crystallographic studies on type 1 poliovirus, *J. Mol. Biol.*, **160**, 663—668.
128. Holland J. (1961). Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans, *Virology*, **15**, 312—326.
129. Holland J. J. (1962). Irreversible eclipse of poliovirus by HeLa cells, *Virology*, **16**, 163—176.
130. Holland J. (1964). Enterovirus entrance into specific host cells and subsequent alterations of cell protein and nucleic acid synthesis, *Bacteriol. Rev.*, **28**, 3—13.
131. Holland J. J., Hoyer B. H., (1962). Early stages of enterovirus infection, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 101—111.
132. Holland J. J., McLaren L. C. (1959). The mammalian cell-virus relationship. II. Adsorption, reception and eclipse of poliovirus by HeLa cells, *J. Exp. Med.*, **109**, 487—504.
133. Holland J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., Vande Pol S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes, *Science*, **215**, 1577—1585.
134. Holoubek V., Crocker T. T. (1971). Histones and RNA metabolism in EAT cells infected with Maus-Elberfeld virus, *Virology*, **43**, 527—530.
135. Howes D. W. (1959). The growth cycle of poliovirus in cultured cells. II. Maturation and release of virus in suspended cell populations, *Virology*, **9**, 96—109.
136. Hruby D. E., Roberts W. K. (1976). Variations in polyadenylic acid content and biological activity, *J. Virol.*, **19**, 325—330.
137. Hsiung G. D., Melnick J. L. (1957). Adsorption, multiplication and cytopathogenicity of enteroviruses in susceptible and resistant monkey kidney cells, *J. Immunol.*, **80**, 45—52.
138. Hummeler K., Anderson T. F., Brown R. A. (1962). Identification of poliovi-

- rus particles of different antigenicity by specific agglutination as seen in the electron microscope, *Virology*, **16**, 84—90.
139. *Hummeler K., Hamparian V. V.* (1958). Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis. I. Demonstration of type and group specific antigens in native and heated viral preparations, *J. Immunol.*, **81**, 499—505.
 140. *Icenogle J., Gilbert S. F., Grieses J., Anderegg J., Rueckert R. R.* (1981). A neutralising monoclonal antibody against poliovirus and its reaction with related antigens, *Virology*, **115**, 211—215.
 141. *Icenogle J., Hong S., Duke G., Gilbert S., Rueckert R., Anderegg J.* (1983). Neutralization of poliovirus by a monoclonal antibody: Kinetics and stoichiometry, *Virology*, **127**, 412—425.
 142. *Jacobson M. F., Asso J., Baltimore D.* (1970). Further evidence on the formation of poliovirus proteins, *J. Mol. Biol.*, **49**, 657—669.
 143. *Jacobson M., Baltimore D.* (1968). Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with the coat protein, *J. Mol. Biol.*, **33**, 369—378.
 144. *Jacobson M., Baltimore D.* (1968). Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 77—84.
 145. *Jen G., Thach R. E.* (1982). Inhibition of host translation in encephalomyocarditis virus-infected L cells: A novel mechanism, *J. Virol.*, **43**, 250—261.
 146. *Johnston M. D., Martin S. J.* (1971). Capsid and procapsid proteins of a bovine enterovirus, *J. Gen. Virol.*, **11**, 71—79.
 147. *Joklik W. K., Darnell J. E.* (1961). The adsorption and early fate of purified poliovirus in HeLa cells, *Virology*, **13**, 439—447.
 148. *Kapikian A. Z.* (1967). Rhinoviruses: A numbering system, *Nature*, **213**, 761—762.
 149. *Kapikian A. Z.* (1969). In: *Diagnostic procedures for Viral and Rickettsial Disease*, 4th edn, ed. by E. H. Lennett and N. J. Schmidt, pp. 603—640, American Public Health Association, New York.
 150. *Kapikian A. Z.* (1971). A collaborative report: Rhinoviruses—extension of the number system, *Virology*, **43**, 524—526.
 151. *Kaplan A. S.* (1955). The susceptibility of monkey kidney cells to poliovirus in vivo and in vitro, *Virology*, **1**, 377—392.
 152. *Katagiri S., Aikawa S., Hinuma Y.* (1971). Stepwise degradation of poliovirus capsid by alkaline treatment, *J. Gen. Virol.*, **13**, 101—109.
 153. *Katagiri S., Hinuma Y., Ishida N.* (1967). Biophysical properties of poliovirus particles irradiated with ultraviolet light, *Virology*, **32**, 337—343.
 154. *Kaufmann Y., Goldstein E., Penman S.* (1976). Poliovirus-induced inhibition of polypeptide initiation in vitro on native polyribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1834—1838.
 155. *Kew O., Nottay B. K.* (1984). Evolution of the oral poliovaccine strains in humans occurs by both mutation and intramolecular recombination. In: *Modern Approaches to Vaccines*, ed. by R. M. Chanock and R. A. Lerner, pp. 357—362, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
 156. *Khesin Y. E., Amchenkova A. M., Gulevich N. E., Narovlyanskii A. E.* (1978). Association between group G chromosomes, especially chromosome G21, and susceptibility of human cells to coxsackie B viruses, *Bull. Exp. Biol. Med. (Eng. Trans.)*, **86**(11), 1493—1496.
 157. *King A. M. G., McCahon D., Slade W. R., Newman J. W. I.* (1982). Recombination in RNA, *Cell*, **29**, 921—928.
 158. *King A. M. Q., Sangar D. V., Harris T. J. R., Brown F.* (1980). Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus, *J. Virol.*, **34**, 627—634.
 159. *Kitamura N., Semler B., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J., Dornier A. J., Emini E. A., Hanecak R., Lee J. J., van der Werf S., Anderson C. W., Wimmer E.* (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA, *Nature*, **291**, 547—553.

160. Klug A., Caspar D. L. D. (1960). The structure of small viruses, *Adv. Virus Res.*, **7**, 225—325.
161. Korant B. D., Lonberg-Holm K., Noble J., Stasny J. T. (1972). Naturally occurring and artificially produced components of three rhinoviruses, *Virology*, **48**, 71—86.
162. Krah D. L., Crowell R. L. (1982). A solid-phase assay of solubilized HeLa cell membrane receptors for binding group B coxsackieviruses and polioviruses, *Virology*, **118**, 148—156.
163. Kunin C. M. (1964). Cellular susceptibility to enteroviruses, *Bacterion. Rev.*, **28**, 382—390.
164. Lacal J. C., Carrasco L. (1982). Relationship between membrane integrity and the inhibition of host translation in virus-infected mammalian cells, *Eur. J. Biochem.*, **127**, 359—366.
165. Landsteiner K., Popper E. (1909). Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen, *Z. Immunitätsforsch. Orig.*, **2**, 377—390.
166. Lawrence C., Thach R. E. (1975). Identification of a viral protein involved in post-translational maturation of the EMC virus capsid precursor, *J. Virol.*, **15**, 918—928.
167. Lazarus L. H., Barzilai R. (1974). Association of foot-and-mouth disease virus replicase with RNA template and cytoplasmic membranes, *J. Gen. Virol.*, **23**, 213—218.
168. Douvier G. L. (1959). The D to C change in poliovirus particles, *Br. J. Exp. Pathol.*, **40**, 605—620.
169. Ledinko N. (1963). Genetic recombination with poliovirus type 1. Studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain, *Virology*, **20**, 107—119.
170. Lee P. W. K., Colter J. S. (1979). Further characterization of mengo subviral particles: A new hypothesis for picornavirus assembly, *Virology*, **97**, 266—274.
171. Lewintow L. (1974). The reproduction of picornaviruses. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, Vol. 2, pp. 109—169, Plenum, New York.
172. Levitt N. H., Crowell R. L. (1967). Comparative studies on regeneration of HeLa cell receptors for poliovirus T1 and coxsackievirus B3, *J. Virol.*, **1**, 693—700.
173. Loeffler F., Frosch P. (1898). Report of the Commission for Research on Foot-and-Mouth Disease, *Centralbl. Bakt. Parasit. Infect.*, Part I, **23**, 371—391, Reprinted in translation (1964). in *Selected Papers on Virology*, ed. by N. Hahon, pp. 64—68, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
174. Lonberg-Holm C. (1980). Attachment of animal virus to cells, an introduction. In: *Receptors and Recognition*, Ser. B, Vol. 8: *Virus Receptors*, Part 2, Animal Viruses, ed. by K. Lonberg-Holm and L. Philipson, pp. 1—20, Chapman and Hall, London.
175. Lonberg-Holm K., Butterworth B. E. (1976). Investigation of the structure of polio- and human rhinovirus through the use of selective chemical reactivity, *Virology*, **71**, 207—216.
176. Lonberg-Holm K., Crowell R. L., Philipson L. (1976). Unrelated animal viruses share receptors, *Nature*, **259**, 679—716.
177. Lonberg-Holm K., Korant B. D. (1972). Early interaction of rhinoviruses with host cells, *J. Virol.*, **9**, 29—40.
178. Lonberg-Holm K., Philipson L. (1974). Early interaction between animal viruses and cells, *Monogr. Virol.*, **9**, 67—70.
179. Lonberg-Holm K., Whiteley N. M. (1976). Physical and metabolic requirements for early interaction of poliovirus and human rhinovirus with HeLa cells, *J. Virol.*, **19**, 857—870.
180. Longworth J. F. (1978). Small isometric viruses of insects, *Adv. Virus Res.*, **23**, 103—157.

181. *Lucas-Lenard J. M.* (1979). Inhibition of cellular protein synthesis after virus infection. In: *The Molecular Biology of Picornaviruses*, ed. by R. Perez-Bercoff, pp. 73—99, Cambridge University Press, New York.
182. *Lund G. A., Ziola B. R., Salmi A., Scraba D. G.* (1977). Structure of the Mengo virion. V. Distribution of the capsid polypeptides with respect to the surface of the virus particle, *Virology*, **78**, 35—44.
183. *Lundquist R. E., Ehrenfeld E., Maizel J. V.* (1974). Isolation of a viral polypeptide associated with the poliovirus replication complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4774—4777.
184. *Maizel J. V.* (1964). Preparative electrophoresis of proteins in acrylamide gels, *N. Y. Acad. Symp. Gel Electrophoresis*, **121** (Art. 2), 382—390.
185. *Maizel J. V., Phillips B. A., Summers D. F.* (1967). Composition of artificially produced and naturally occurring empty capsids of poliovirus type 1, *Virology*, **32**, 692—699.
186. *Mak T. W., Colter J. S., Scraba D. G.* (1974). Structure of the mengovirion. II. Physico-chemical and electron microscopic analysis of degraded virus, *Virology*, **57**, 543—553.
187. *Mak T. W., O'Callaghan D. J., Colter J. S.* (1970). Studies of the pH inactivation of three variants of mengo encephalomyelitis virus, *Virology*, **40**, 565—571.
188. *Mandel B.* (1962). Early stages of virus-cell interaction as studied by using antibody, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 123—130.
189. *Mandel B.* (1965). The fate of the inoculum in HeLa cells infected with poliovirus, *Virology*, **25**, 152—154.
190. *Mandel B.* (1967). Relationship between penetration and uncoating of poliovirus in HeLa cells, *Virology*, **31**, 702—712.
191. *Mandel B.* (1979). Interaction of viruses with neutralizing antibodies. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, Vol. 15, pp. 37—121, Plenum, New York.
192. *Mapoles J. E., Andereg J. W., Rueckert R. R.* (1978). Properties of poliovirus propagated in medium containing cesium chloride. Implications for picornaviral structure, *Virology*, **90**, 103—111.
193. *Marongiu M. E., Pani A., Corrias M. V., Sau M., La Colla P.* (1981). Poliovirus morphogenesis. I. Identification of 80S dissociable particles and evidence for the artifactual production of procapsids, *J. Virology*, **39**, 341—347.
194. *Matthews R. E. F.* (1982). Classification and nomenclature of viruses, *Intervirology*, **17**, 1—199.
195. *Mayer M. M., Rapp H. J., Roizman B., Klein S. W., Cowan K. M., Lukens D., Schwerdt C. E., Schaffer F. L., Charney J.* (1957). The purification of poliomyelitis virus as studied by complement fixation, *J. Immunol.*, **78**, 435—455.
196. *Mayor H. D.* (1964). Picornavirus symmetry, *Virology*, **22**, 156—160.
197. *McCahon D.* (1981). The genetics of aphthovirus, *Arch. Virol.*, **69**, 1—23.
198. *McClintock P. R., Billups L. C., Notkins A. L.* (1980). Receptors for encephalomyocarditis virus on murine and human cells, *Virology*, **106**, 261—272.
199. *McCormick W., Penman S.* (1967). Inhibition of RNA synthesis in HeLa and L cells mengovirus, *Virology*, **31**, 135—141.
200. *McGeady M. L., Crowell R. L.* (1979). Stabilization of "A" particles of coxsackievirus B3 by a HeLa cell plasma membrane extract, *J. Virol.*, **32**, 790.
201. *McGregor S., Hall L., Rueckert R. R.* (1975). Evidence for the existence of protomers in the assembly of encephalomyocarditis virus, *J. Virol.*, **15**, 1107—1120.
202. *McGregor S., Rueckert R. R.* (1977). Picornaviral capsid assembly: Similarity of rhinovirus and enterovirus precursor subunits, *J. Virol.*, **21**, 548—553.
203. *McLaren L. C., Holland J. J., Syverton J. T.* (1960). The mammalian cell-virus relationship. V. Susceptibility and resistance of cells in vitro to infection by coxsackie A9 virus, *J. Exp. Med.*, **112**, 581—594.

204. McLean C., Matthews T. J., Rueckert R. R. (1976). Evidence of ambiguous processing and selective degradation in the noncapsid proteins of rhinovirus 1A, *J. Virol.*, **19**, 903—914.
205. McSharry J. J., Caligiuri L. A., Eggers H. J. (1979). Inhibition of uncoating of poliovirus by arildone, a new antiviral drug, *Virology*, **97**, 307—315.
206. Medappa K. C., McLean C., Rueckert R. R. (1971). On the structure of rhinovirus 1A, *Virology*, **44**, 259—270.
207. Medappa K. C., Rueckert R. R. (1974). Binding of cesium ions to human rhinovirus 14, *Abstr. Am. Soc. Microbiol.*, p. 207.
208. Melnick J. L. (1976). Enteroviruses. In: *Viral Infections of Humans*, ed. by A. S. Evans, pp. 163—208, Plenum Medical Book Co., New York.
209. Melnick J. L. (1983). Portraits of viruses: The picornaviruses, *Intervirology*, **20**, 61—100.
210. Melnick J. L. (1983). Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1, *Intervirology*, **4**, 303.
211. Melnick J. L. (1974). Picornaviridae, *Intervirology*, **4**, 303—316.
212. Melnick J. L., Wenner H. A. (1969). The enteroviruses. In: *Diagnostic Procedures for Viral and rickettsial Disease*, 4th Ed., ed. by E. H. Lennette and N. J. Schmidt, pp. 529—602, American Public Health Association, New York.
213. Miller D. A., Miller O. J., Dev V. G., Hashmi S., Tantravahi R., Medrano L., Green H. (1974). Human chromosome 19 carries a poliovirus receptor gene, *Cell*, **1**, 167—173.
214. Miller R. L., Plagemann P. G. W. (1974). Effect of ultraviolet light on mengovirus: Formation of uracil dimers, instability and degradation of capsid, and covalent linkage of protein to viral RNA, *Virology*, **13**, 729—739.
215. Minor P. D., Schild G. C., Bootman J., Evans D. M. A., Ferguson M., Reeve P., Spitz M., Stanway G., Cann A. J., Haptmann R., Clarke L. D., Mountford R. C., Almond J. W. (1983). Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization, *Nature*, **304**, 674—679.
216. Monod J., Wyman J., Changeux J. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118.
217. Montagnier L., Sanders F. K. (1963). Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid, *Nature*, **199**, 664—667.
218. Moore N. F., Tinsley T. W. (1982). The small RNA viruses of insects, *Arch. Virol.*, **72**, 229—245.
219. Mosser A. G., Hong S.-W., Icenogle J., Rueckert R. R. (1981). Poliovirus procapsid is N-antigenic, *Abstr. Mtg. Amer. Soc. Microbiol.*, p. 258.
220. Much D. H., Zajac I. (1973). Homology of surface receptors for poliovirus on mammalian cell lines, *J. Gen. Virol.*, **21**, 385—390.
221. Newman J. F. E., Rowlands D. J., Brown F. (1973). A physicochemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses, *J. Gen. Virol.*, **18**, 171—180.
222. Newman J. F. E., Rowlands D. J., Brown F., Goodridge D., Burrows R., Steck F. (1977). Physicochemical characterization of two serologically unrelated equine rhinoviruses, *Intervirology*, **8**, 145—154.
223. Ninomiya Y., Ohsawa C., Aoyama M., Umeda I., Suhara Y., Ishipsuka H. (1984). Antivirus agent, Ro 09—0410 binds to rhinovirus specifically and stabilizes the virus conformation, *Virology*, **34**, 269—276.
224. Nomoto A. (1984). Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants, *J. Mol. Biol.*, **174**, 561—585.
225. Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E. (1977). Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis, *Nature*, **268**, 208—213.
226. Nomoto A., Lee Y. F., Wimmer E. (1976). The 5'-end of poliovirus mRNA is not capped with m⁷ G(5')ppp(5')Np, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 375—380.

227. Nomoto A., Omata T., Toyoda H., Kuge S., Horie N., Kataoka H., Genba Y., Nakano Y., Imura N. (1982). Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin a strain genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5793—5797.
228. Oberg B. F., Philipson L. (1971). Replicative structures of poliovirus RNA in vivo, *J. Mol. Biol.*, **58**, 725—737.
229. Otto M. J., Lucas-Lenard J. (1980). The influence of the host cell on the inhibition of viral protein synthesis in cells doubly-infected with vesicular stomatitis virus and mengovirus, *J. Gen. Virol.*, **50**, 293—307.
230. Pallansch M. A., Kew O. M., Palmengerg A. C., Golini F., Wimmer E., Rueckert R. R. (1980). Picornaviral VPg sequences are contained in the replicase precursor, *J. Virol.*, **35**, 414—419.
231. Pallansch M. A., Kew O. M., Semler B. L., Omilianowski D. R., Anderson C. W., Wimmer E., Rueckert R. R. (1984). Protein processing map of poliovirus, *J. Virol.*, **49**, 873—880.
232. Palmenberg A. C. (1982). In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures, *J. Virol.*, **44**, 900—906.
233. Palmenberg A. C., Kirby E. M., Janda M. R., Drake N. L., Duke G. M., Potratz K. F., Collett M. S. (1984). The nucleotide and deduced sequences of the encephalomyocarditis viral polypeptide coding region, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2969—2985.
234. Palmenberg A. C., Pallansch M. A., Rueckert R. R. (1979). Protease required for processing picornaviral coat protein resides in the viral replicase gene, *J. Virol.*, **32**, 770—778.
235. Palmenberg A. C., Rueckert R. R. (1982). Evidence for intramolecular self-cleavage of picornaviral replicase precursors, *J. Virol.*, **41**, 244—249.
236. Paul J. (1971). *A History of Poliomyelitis Virus*, Yale University Press, New Haven.
237. Pelham H. R. (1978). Translation of encephalomyocarditis virus RNA in vitro yields an active proteolytic enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **85**, 457—462.
238. Pelham H. R., Jackson R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates, *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247—256.
239. Penman S., Becker Y., Darnell J. E. (1964). A cytoplasmic structure involved in the synthesis and assembly of poliovirus components, *J. Mol. Biol.*, **8**, 541—555.
240. Penman S., Summers D. (1965). Effects on host cell metabolism following synchronous infection with poliovirus, *Virology*, **27**, 614—620.
241. Perez-Bercoff R., Gander M. (1977). The genomic RNA of mengovirus. I. Location of the poly(C) tract, *Virology*, **80**, 426—429.
242. Perlin M., Phillips B. A. (1973). In vitro assembly of polioviruses. III. Assembly of 14S particles into empty capsids by poliovirus-infected HeLa cell membranes, *Virology*, **53**, 107—114.
243. Philipson L. (1963). The early interaction of animal viruses and cells, *Prog. Med. Virol.*, **5**, 43—78.
244. Philipson L., Bengtsson S., Brishammer S., Svennerholm L., Zetterquist O. (1964). Purification and chemical analysis of the erythrocyte receptor for hemagglutinating enteroviruses, *Virology*, **22**, 580—590.
245. Philipson L., Choppin P. W. (1962). Inactivation of enteroviruses by 2,3-dimercaptopropanol (BAL), *Virology*, **16**, 404—413.
246. Phillips B. A. (1969). In vitro assembly of polioviruses. I. Kinetics of the assembly of empty capsids and the role of extracts from infected cells, *Virology*, **39**, 811—821.
247. Phillips B. A. (1969). In vitro assembly of poliovirus. II. Evidence for the self-assembly of 14S particles into empty capsids, *Virology*, **44**, 307—316.
248. Phillips B. A., Lundquist R. E., Maizel J. V. (1980). Absence of subviral particles and assembly activity in HeLa cells infected with defective-interfering (DI) particles of poliovirus, *Virology*, **100**, 116—124.

249. *Phillips B. A., Summers D. F., Maizel J. V.* (1968). In vitro assembly of poliovirus-related particles, *Virology*, **88**, 92104.
250. *Plummer G.* (1965). The picornaviruses in man and animals: A comparative review, *Prog. Med. Virol.*, **7**, 326—361.
251. *Pons M.* (1964). Infectious double-stranded poliovirus RNA, *Virology*, **24**, 467—473.
252. *Prather S. O., Taylor M. W.* (1975). Host-dependent restriction of mengovirus replication. III. Effect of host restriction on late viral RNA synthesis and viral maturation, *J. Virol.*, **15**, 872—881.
253. *Provost P. J., Hilleman M. R.* (1979). Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **160**, 213—221.
254. *Putnak J. R., Phillips B. A.* (1981). Picornaviral structure and assembly, *Microbiol. Rev.*, **45**, 287—315.
255. *Quersin-Thiry L.* (1961). Interactions between cellular extracts and animal viruses. I. Kinetic studies and some notes on the specificity of the interaction, *Acta Virol. Praha*, **5**, 141—152.
256. *Quersin-Thiry L., Nihoul E.* (1961). Interaction between cellular extracts and animal viruses. II. Evidence for the presence of different inactivators corresponding to different viruses, *Acta Virol. Praha*, **5**, 283—293.
257. *Racaniello V. R., Baltimore D.* (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4887—4891.
258. *Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L.* (1961). Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production, *Science*, **134**, 556—557.
259. *Rice J. M., Wolff D. A.* (1975). Phospholipase in the lysosomes of HEp-2 cells and its release during poliovirus infection, *Biochim. biophys. Acta*, **381**, 17—21.
260. *Richards O. C., Morton K., Martin S. C., Ehrenfeld E.* (1984). Two forms of poliovirus VPG result from amino acid modification of a single viral protein, *Virology*, **136**, 453—456.
261. *Roizman B., Hopken W., Mayer M. M.* (1957). Immunological studies of poliovirus. II. Kinetics of the formation of infectious and noninfectious type 1 poliovirus in three cell strains of human derivation, *J. Immunol.*, **80**, 386—395.
262. *Roizman B., Mayer M. M., Roane P. R.* (1959). Immunochemical studies of poliovirus. IV. Alteration of the immunologic specificity of purified poliomyelitis virus by heat and ultraviolet light, *J. Immunol.*, **82**, 19—25.
263. *Romanova L. I., Tolskaya E. A., Kolesnikova M. S., Agol V. I.* (1980). Biochemical evidence for intertypic recombination of polioviruses, *FEBS Lett.*, **118**, 109—112.
264. *Rombaut B., Vrijesen R., Boeye A.* (1984). In vitro assembly of poliovirus empty capsids: Antigenic consequences and immunological assay of the morphopoietic factor, *Virology*, **135**, 546—550.
265. *Roumiantzeff M., Summers D. F., Maizel J. V.* (1971). In vitro protein synthetic activity of membrane-bound poliovirus polyribosomes, *Virology*, **44**, 249—258.
266. *Rowlands D. J., Clarke B. E., Carroll A. R., Brown F., Nicholson B. H., Bittle J. L., Houghten R. A., Lerner R. A.* (1983). Chemical basis of antigenic variation in foot and mouth disease virus, *Nature*, **306**, 694—697.
267. *Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F.* (1978). More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA, *J. Virol.*, **26**, 335—343.
268. *Rowlands D. J., Shirley M. W., Sanger D. V., Brown F.* (1975). A high density component in several vertebrate enteroviruses, *J. Gen. Virol.*, **29**, 223—234.
269. *Rueckert R. R.* (1971). Picornaviral architecture. In: *Comparative Virology*,

- ed. by K. Maramorosch and E. Kurstak, pp. 255—306, Academic Press, New York.
270. Rueckert R. R. (1976). On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In: Comprehensive Virology, Vol. 6, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 131—213, Plenum, New York.
 271. Rueckert R. R., Dunker A. K., Stoltzfus C. M. (1969). The structure of Maus-Elberfeld virus: A model, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **62**, 912—919.
 272. Rueckert R. R., Matthews T. J., Kew O. M., Pallansch M., McLean C., Omi-lanowski D. (1979). Synthesis and processing of picornaviral polyprotein. In: The Molecular Biology of Picornaviruses, ed. by R. Perez-Bercoff, pp. 113—125, Plenum Press, New York and London.
 273. Rueckert R. R., Pallansch M. A. (1981). Preparation and characterization of encephalomyocarditis virus. In: Methods in Enzymology ed. by S. Pestka, Vol. 78, pp. 315—325, Academic Press, New York.
 274. Rueckert R. R., Wimmer E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins, J. Virol., **50**, 957—959.
 275. Sabin A. B. (1957). Properties of attenuated polioviruses and their behavior in human beings. In: Cellular Biology, Nucleic Acids and Viruses, Vol. 5, pp. 113—140, New York Academy of Science Press.
 276. Sangar D. V. (1979). The replication of picornaviruses, J. Gen. Virol., **45**, 1—11.
 277. Saunders K., King A. M. O. (1982). Guanidine-resistant mutants of aphtho-virus induce the synthesis of an altered nonstructural polypeptide, P34, J. Virol., **42**, 389—394.
 278. Schaffer F. L., Gordon M. (1966). Differential inhibitory effects of actino-mycin D among strains of poliovirus, J. Bacteriol., **91**, 2309—2316.
 279. Schaffer F. L., Hackett A. J. (1963). Early events in poliovirus-HeLa cell interaction: Acridine orange photosensitization and detergent extracts, Virology, **21**, 124—126.
 280. Schaffer F. L., Schwerdt C. E. (1955). Crystallization of purified MEF-1 poliomyelitis virus particles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **41**, 1020—1023.
 281. Scharff M. D., Levintow L. (1963). Quantitative study of the formation of poliovirus antigens in infected HeLa cells, Virology, **19**, 491—500.
 282. Scharff M. D., Maizel J. V., Levintow L. (1964). Physical and immunological properties of a soluble precursor of the poliovirus capsid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **51**, 329—337.
 283. Schild G. C., Minor P. D., Evans D. M. A., Ferguson M., Stanway G., Al-mond J. W. (1983). Molecular basis for the antigenicity and virulence of poliovirus type 3. In: Modern Approaches to Vaccines, ed. by R. M. Chan-nock and R. A. Lerner, pp. 27—35, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 284. Schultz M., Crowell R. L. (1980). Acquisition of susceptibility to coxsackie-virus A2 by the rat L8 line during myogenic differentiation, J. Gen. Virol., **46**, 39—49.
 285. Schwerdt C. E., Fogh J. (1957). The ratio of physical particles per infectious unit observed for poliomyelitis virus, Virology, **4**, 590—593.
 286. Scotti P. D., Longworth J. F., Plus N., Croizier G., Reinganum C. (1981). The biology and ecology of strains of an insect small RNA virus complex, Adv. Virus Res., **26**, 117—142.
 287. Sehgal O. P., Jean J.-H., Bhalla R. B., Soong M. M., Drause G. F. (1970). Correlation between buoyant density and ribonucleic acid content in viruses, Phytopathology, **60**, 1778—1784.
 288. Semler B. L., Anderson C. W., Kitamura N., Rothberg P. G., Wishart W. L., Wimmer E. (1981). Poliovirus replication proteins: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolytic processing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3464—3468.
 289. Shih D. S., Shih C. T., Kew O., Pallansch M., Rueckert R., Kaesberg P.

- (1978). Cell free synthesis and processing of the proteins of poliovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5807—5811.
290. *Smith A. E.* (1973). The initiation of protein synthesis directed by the RNA from encephalomyocarditis virus, *Eur. J. Biochem.*, **33**, 301—313.
 291. *Spector D. H., Baltimore D.* (1974). Requirement of 3'-terminal polyadenylic acid for the infectivity of poliovirus RN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2983—2987.
 292. *Steere R. L., Schaffer F. L.* (1958). The structure of crystals of purified Mahoney poliovirus, *Biochim. Biophys. Acta*, **28**, 241—246.
 293. *Strohmaier K., Franze R., Adam K.-H.* (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein, *J. Gen. Virol.*, **59**, 295—306.
 294. *Summers D. F., Maizel J. V.* (1971). Determination of the gene sequence of poliovirus with pactamycin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2852—2856.
 295. *Summers D. F., Maizel J. V., Darnell J. E.* (1965). Evidence for virus-specific noncapsid proteins in poliovirus-infected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 505—513.
 296. *Svitkin Y. V., Gorbalenya A. E., Kazachkov Y. A., Agol V. I.* (1979). Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 possessing a proteolytic activity: Preliminary mapping of the viral genome, *FEBS Lett.*, **108**, 6—9.
 297. *Taber R., Rekosh D., Baltimore D.* (1971). Effect of pactamycin on synthesis of poliovirus proteins: A method for genetic mapping, *J. Virol.*, **8**, 395—410.
 298. *Talbot P., Brown F.* (1972). A model for foot-and-mouth disease virus, *J. Gen. Virol.*, **15**, 163—170.
 299. *Tamm I., Eggers H. J.* (1963). Specific inhibition of replication of animal viruses, *Science*, **142**, 24—33.
 300. *Tershak D. R.* (1982). Inhibition of poliovirus polymerase by guanidine in vitro, *J. Virol.*, **41**, 213—318.
 301. *Tinsley T. W., MacCallum F. O., Robertson J. S., Brown F.* (1984). Relationship of encephalomyocarditis virus to cricket paralysis virus of insects, *Intervirology*, **21**, 181—186.
 302. *Tobey R. A., Peterson D. F., Anderson E. C.* (1965). Mengovirus replication. IV. Inhibition of Chinese hamster ovary cell division as a result of infection, *Virology*, **27**, 17—22.
 303. *Toyoda H., Kohara M., Kataoka Y., Suganuma T., Omata T., Imura N., Nomoto A.* (1984). Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants, *J. Mol. Biol.*, **174**, 561—585.
 304. *Traub V., Traub P.* (1978). Changes in the microheterogeneity of histone H1 after mengovirus infection of EAT cells, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **359**, 581—592.
 305. *Tyrrell D. A. J., Chanock R. M.* (1963). Rhinoviruses. A description, *Science*, **141**, 152—153.
 306. *Van der Marel P., Hazendonk T. G., Heneke M. A. C., van Wezel A. L.* (1983). Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides, VP1, VP2 and VP3, *Vaccine*, **1**, 17—22.
 307. *Vande Woude G. F., Swaney J. B., Bachrach H. L.* (1972). Chemical and physical properties of foot-and-mouth disease virus: A comparison with Maus-Eelberfeld virus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1222—1229.
 308. *Van Dyke T. A., Flanagan J. B.* (1980). Identification of poliovirus polypeptide p63 as a soluble RNA-dependent RNA polymerase, *J. Virol.*, **35**, 732—740.
 309. *Van Dyke T. A., Rickles R. J., Flanagan J. B.* (1982). Genome-length copies of poliovirus RNA are synthesized in vitro by the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, **257**, 4610—4617.
 310. *Vasquez D., Denoya C. D., LaTorre J. L., Palma E. L.* (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capsid, *Virology*, **97**, 195—200.

311. *von Magnus H., Gear J. H. S., Paul J. R.* (1955). A recent definition of poliomyelitis viruses, *Virology*, **1**, 185—189.
312. *Watanabe Y., Watanabe K., Hinuma Y.* (1962). Synthesis of poliovirus-specific proteins in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 976—977.
313. *Wetz K., Habermehl K.-O.* (1979). Topographical studies on poliovirus capsid proteins by chemical modification and cross-linking with difunctional reagents, *J. Gen. Virol.*, **44**, 525—534.
314. *Wetz K., Habermehl K.-O.* (1982). Specific cross-linking of capsid proteins to virus RNA by ultraviolet irradiation of poliovirus, *J. Gen. Virol.*, **59**, 397—401.
315. *Wetz K., Zeichardt H., Willingmann P., Habermehl K.-O.* (1983). Dense particles and slow sedimenting particles produced by ultraviolet irradiation of poliovirus, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1263—1275.
316. *Wild T. F., Burroughs J. N., Brown F.* (1969). Surface structure of foot-and-mouth disease virus, *J. Gen. Virol.*, **4**, 313—320.
317. *Wilson J. N., Cooper P. D.* (1963). Aspects of the growth of poliovirus as revealed by the photodynamic effects of neutral red and acridine orange, *Virology*, **21**, 135—145.
318. *Wimmer E.* (1982). Genome-linked proteins of viruses, *Cell*, 199—201.
319. *Wolff D. A., Bubel H. C.* (1964). The disposition of lysosomal enzymes as related to specific viral cytopathic effects, *Virology*, **24**, 502—505.
320. *Yamaguchi-Koll U., Wieger K. J., Drzeniek R.* (1975). Isolation and characterization of "dense particles" from poliovirus-infected HeLa cells, *J. Gen. Virol.*, **26**, 307—319.
321. *Yin F. H.* (1977). Involvement of viral procapsid in the RNA synthesis and maturation of poliovirus, *Virology*, **82**, 299—307.
322. *Yin F. H., Lomax N. B.* (1983). Host range mutants of human rhinovirus in which nonstructural proteins are altered, *J. Virol.*, **48**, 410—418.
323. *Yogo Y., Wimmer E.* (1975). Sequence studies of poliovirus RNA. III. Polyuridylic acid and polyadenylic acid as components of the of purified poliovirus replicative intermediate, *J. Mol. Biol.*, **92**, 467—477.
324. *Yoon J. W., Onodera T., Notkins A.* (1978). Virus-induced diabetes mellitus. XV. Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice infected with coxsackievirus B4, *J. Exp. Med.*, **148**, 1068—1080.
325. *Zajac I., Crowell R. L.* (1965). Effect of enzymes on the interaction of enteroviruses with living HeLa cells, *J. Bacteriol.*, **89**, 1097—1100.
326. *Zajac I., Crowell R. L.* (1969). Differential inhibition of attachment and eclipse activities of HeLa cells for enteroviruses, *J. Virol.*, **3**, 422—428.
327. *Ziola B. R., Scraba D. G.* (1976). Structure of the mengo virion. IV. Amino and carboxyl-terminal analyses of the major capsid polypeptides, *Virology*, **71**, 111—121.

Реовирусы

Кеннет Л. Тайлер, Бернард Н. Филдс¹

Исторические аспекты

В 1959 г. Сэбин предложил выделить в отдельную группу вирусы, ранее классифицированные как ЕСНО-10. Поскольку эти вирусы, обычно выделяемые из дыхательных путей и пищеварительного тракта, не были связаны ни с одним из известных заболеваний, он назвал их реовирусами (*reovirus* — *respiratory, enteric, orphan viruses*) [41]. В начале 70-х гг. из группы неклассифицированных арбовирусов были выделены орбивирусы и тоже отнесены к сем. *Reoviridae*. Основой для изменения классификации послужили обнаруженные отличия орбивирусов от других арбовирусов — отсутствие оболочки и наличие сегментированной двухцепочечной геномной РНК [4]. Семейство реовирусов еще раз пополнилось в конце 70-х гг., когда установили, что группа вирусов, названная ротавирусами за особенности их морфологии, также содержит сегментированный двухцепочечный РНК-геном [16]. К реовирусам относят также три группы вирусов с сегментированным РНК-геномом, инфекционные для насекомых и растений (циповирусы, фитовирусы, фидживирусы) [28, 31].

Сем. *Reoviridae* в его современном виде состоит из шести родов. Три из них — ортореовирусы, орбивирусы и ротавирусы — инфекционны для животных и человека; остальные три включают вирусы, инфекционные только для растений и насекомых. Вирусы, относящиеся ко всем этим родам, объединены в семейство на основе сходства их структуры, особенностей генома и стратегии репликации (табл. 19.1).

Каждая из общих характеристик семейства, приведенных в табл. 19.1, отражает наиболее важные особенности трех родов сем. *Reoviridae*, инфекционных для человека и животных. Три другие группы реовирусов мы здесь обсуждать не будем. До-

¹ *Kenneth L. Tyler, Bernard N. Fields*, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.

Таблица 19.1. Наиболее характерные свойства реовирусов

Структура	Размер ~ 70 нм Форма икосаэдрическая (близка к сферической) Отсутствует гликопротеиновая оболочка Двухкапсидная структура
Геном	Двухцепочечная РНК 10—12 сегментов
Репликация	Осуществляется в цитоплазме Формируются внутриклеточные включения Не происходит полного раздевания вириона Образуются полноразмерные экпированные (5') не полиаденилированные мРНК-транскрипты Имеются все ферменты, необходимые для тран- скрипции дцРНК

полнительную информацию о них можно найти в обзорах [17, 37]. Более подробно особенности орторевирусов («реовирусов»), орбивирусов и ротавирусов описаны в последующих главах.

Структура

Орби-, рота- и орторевирусы имеют внутреннюю сердцевину примерно одинакового размера (50—65 нм) с икосаэдрической симметрией и легко различимыми субъединицами (капсомерами). В случае орторевирусов сердцевину в основном составляют три белка ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\sigma 2$); в небольших количествах присутствуют и три других белка ($\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$) [22, 32]. Белок $\lambda 2$ образует «шпиль» на 12 вершинах сердцевины. Сердцевина ротавирусов на 80% состоит из белка VP6, почти вся оставшаяся часть приходится на белок VP2. В небольших количествах в сердцевине содержится еще один белок — VP1. Сердцевина орбивирусов состоит из пяти белков (P1, P3, P4, P6, P7) [52] (табл. 19.2).

Различные представители сем. Reoviridae имеют существенно разную структуру наружного капсида [23, 36, 51]. У орторевирусов наружный капсид четко выражен и состоит из гекса- и пентагональных субъединиц, построенных в основном из двух белков ($\mu 1C$ и $\sigma 3$). У каждой из 12 вершин икосаэдра располагаются по две молекулы белка $\sigma 1$. Нуклеокапсиды орбивирусов окружены диффузным слоем, состоящим из двух белков (P2, P5). Этот наружный капсид не содержит выраженных морфологических структур, как и капсид ротавирусов. Однако последний по данным электронной микроскопии имеет

Таблица 19.2. Белки реовирусов и их предполагаемая локализация ¹⁾

Наружный капсид	Сердцевина (нуклеокапсид)	Неструктурные белки
Ортореовирусы σ3, μ1C Минорный белок σ1	λ1, σ2, λ2 (образуют «шипы») Минорные белки: λ3, μ2, μ1	μNS σNS
Орбивирусы P2, P5	P3, P7 Минорные белки: P1, P4, P6	P5a, P6a
Ротавирусы VP3, VP7 Минорные белки: VP5, VP10, VP10c	VP2, VP6 Минорные белки: VP1, VP3 (p91), VP4 (p84)	VP8, VP9 VP11 VP12

¹⁾ Номенклатура ротавирусных белков до конца не разработана, а локализация белков орбивирусов может быть неодинаковой у разных вирусов. Подробнее см. гл. 20.

более четкие рельефные особенности. Он состоит в основном из двух белков (VP3, VP7).

Физико-химические свойства

Как и можно было предположить, различные члены сем. Reoviridae обладают примерно одинаковой плавучей плотностью в градиенте плотности CsCl (1,36 г/см³) [40, 48, 52]. При —70°C они остаются стабильными сколь угодно долго и даже при обычной температуре теряют инфекционность довольно медленно [45]. Орто- и ротавирусы устойчивы к хлороформу и другим органическим растворителям и стабильны в широком диапазоне pH [12]. Орбивирусы менее устойчивы, и обычно их инфекционность уменьшается после обработки детергентами и органическими растворителями в стандартных условиях [52]. При низких pH орбивирусы утрачивают свою инфекционность [52], резко отличаясь этим от других представителей сем. Reoviridae, стабильных в интервале pH от 3 до 9 [15].

Геном

Все представители сем. Reoviridae содержат сегментированный геном, представленный двухцепочечной РНК. У орторео- и орбивирусов таких сегментов 10 [44, 53], у ротавирусов — 11 [34, 40]. Наибольшую молекулярную массу имеет геном ортореовирусов (15·10⁶) [44], а наименьшую — геном орбивирусов (12·10⁶) [53]; мол. масса генома ротавирусов составляет

$(11-14) \cdot 10^6$ [22]. Четкое соответствие между разными классами сегментов РНК разных групп реовирусов отсутствует. У орторевирусов мол. масса наибольшего сегмента равна примерно $2,7 \cdot 10^6$, у орбивирусов $2,5 \cdot 10^6$, у ротавирусов $1,1 \cdot 10^6$. Самые низкомолекулярные сегменты рота- и орбивирусов меньше, чем у реовирусов: их мол. масса составляет $2 \cdot 10^5$. Эти величины соответствуют размерам от 4500 пар нуклеотидов (сегмент L реовирусов) до 680 (малый сегмент ротавирусов).

Репликация

Первые этапы взаимодействия реовирусов с поверхностью клетки-хозяина не установлены. Связывание орторевирусов с клеткой осуществляется с помощью белка $\sigma 1$ [30, 54]. Именно он ответствен за клеточную и тканевую тропность вируса и служит вирусным гемагглютинином [55—57]. Гемагглютинином ротавирусов является белок наружного капсида VP3, но какой из ротавирусных белков участвует в присоединении вириона к клетке — неизвестно [22]. Вирулентность орбивирусов определяется белками наружного капсида P2, P5; возможно, их функция аналогична функции белка $\sigma 1$ реовирусов (гл. 38).

Природа клеточных рецепторов для реовирусов не установлена. Предполагали, что таким рецептором может быть лактаза [22] или какой-либо другой компонент клеток ворсинок кишечника. Обработка эритроцитов нейраминидазой препятствует их агглютинации ротавирусами и предотвращает заражение ротавирусами клеток МА-104. Отсюда следует, что важным компонентом рецептора для ротавирусов являются остатки сиаловой кислоты [2, 22].

После адсорбции и проникновения в клетку орторео-, орби- и ротавирусы появляются в эндосомах [9, 39, 46, 47]. Именно здесь происходит раздевание вирионов. Протеазы лизосом последовательно удаляют белки $\sigma 3$, $\mu 1C$ и $\sigma 1$ [6, 47]. Одновременно с деградацией $\mu 1C$ происходит активация вирусной транскриптазы [5]. Раздевание и последующая репликация ротавирусов ускоряются также триптическим гидролизом белка наружного капсида VP3 (p84) [7, 13, 14, 22]. У орбивирусов не выявлено расщепления капсидных белков, подобного расщеплению $\mu 1 \rightarrow \mu 1C$ у орторевирусов и $VP3 \rightarrow VP5^*$, $VP8^*$ у ротавирусов. Однако для инициации транскрипции их генома, по-видимому, необходимо удаление белков наружного капсида [20, 51].

Вначале транскрибируется исключительно минус-цепь РНК. Полноразмерные продукты транскрипции служат матрицами как для синтеза вирусных белков, так и для репликации [3, 8, 25, 26, 43, 52]. У орторео- и ротавирусов мРНК экпированы с 5'-конца [18, 43]. Они кодируют все ферменты, необходимые для

осуществления этой модификации РНК. У орбивирусов кэпирующие ферменты не обнаружены [52]. У реовирусов мРНК не полиаденилированы [43].

Природа вирусной транскриптазы не устновлена ни для одного из реовирусов. Известно, что белок $\lambda 3$, кодируемый геном L1 ортореовирусов, определяет оптимум рН для транскриптазы [11]. Предполагают, что каталитический центр транскриптазы этих вирусов формируется двумя белками — $\lambda 1$ и $\lambda 2$ [33]. О транскриптазах рота- и орбивирусов пока ничего не известно.

В том случае, если у реовирусов нет специального механизма регуляции транскрипции, количество РНК, считываемой с каждого гена, должно быть пропорционально длине соответствующей РНК. Такое соотношение соблюдается для восьми генов вируса синего языка (орбивирус) и не соблюдается для двух других генов: ген 5 транскрибируется быстрее, а ген 10—медленнее остальных [25]. Есть сведения, что частота транскрипции генов ортореовирусов примерно пропорциональна их размеру [27]. Возможно, для транскрипции некоторых генов ортореовирусов необходимо, чтобы предварительно были синтезированы определенные белки. Показано, что гены L1, M3, S3 и S4 не нуждаются в таких белках, а для транскрипции остальных шести генов необходим белок, кодируемый одним из «ранних» вирусных генов [35, 58].

В зараженных клетках уровень трансляции вирусных мРНК постепенно начинает превышать уровень синтеза мРНК клетки-хозяина. Как мы уже отмечали, и орторео-, и ротавирусы содержат кэпирующие ферменты и все ранние вирусные мРНК кэпированы с 5'-конца. Преобладание трансляции вирусных матриц в клетке-хозяине связано с появлением некэпированных мРНК. Поскольку все клеточные мРНК в отличие от поздних вирусных мРНК кэпированы, высказывалось предположение, что переключение на «кэп-независимую» трансляцию и определяет преобладание синтеза вирусных белков [58]. У орбивирусов нет деления на «ранний» и «поздний» этапы белкового синтеза и нет данных о регуляции уровня трансляции мРНК.

Детали сборки реовирусов и выхода их из клетки мало изучены. Репликация всех групп реовирусов осуществляется в цитоплазме и сопровождается образованием включений. Любопытной особенностью репликации реовирусов является формирование тубулярных структур, ассоциированных с местами сборки вирионов. Сборка ортореовирусов тесно связана с микротрубочками и промежуточными филаментами [10, 42]. Орбивирусы в ходе своего морфогенеза также ассоциированы с тубулярными структурами [9, 49], построенными из неструктурного вирус-специфического белка Р5а [24].

Особенностью репликации ротавирусов является связь с эндоплазматическим ретикулумом, где осуществляются созревание и отпочковывание вирионов [1, 38].

Выход реовирусов из клеток обычно происходит после лизиса последних. Сообщалось об отпочковывании орбивирусов от поверхности зараженных клеток, однако большинство частиц освобождается все-таки только после лизиса [20].

Круг хозяев и патогенность

Ортореовирусы, по-видимому, не являются возбудителями каких-либо заболеваний человека, хотя и были выделены от различных больных. Ортореовирусы млекопитающих и птиц также не вызывают заболеваний, имеющих экономическое значение (гл. 20).

Ротавирусы считают одним из основных возбудителей энтерита и диареи новорожденных. Диарея является одной из основных причин детской смертности, особенно в слаборазвитых странах. Ротавирусы вызывают также диарею у коров и свиней.

Орбивирусы, за исключением вируса колорадской клещевой лихорадки, вызывают в основном заболевания у животных. Они отличаются от других представителей сем. *Reoviridae*, инфекционных для животных, поскольку их жизненный цикл обязательно включает стадию, когда они персистируют в организме переносчика — насекомого. Орбивирусы вызывают ряд заболеваний у животных, включая африканскую болезнь лошадей, энцефалоз лошадей, геморрагическую болезнь оленей и коров, болезнь синего языка овец. Вирус колорадской клещевой лихорадки вызывает у людей тяжелое заболевание, подобное денге, а также энцефалит. Оно развивается после укуса клеща *Dermacentor andersoni*, который встречается в Скалистых горах США и на северо-западе Канады.

Литература

1. *Altenberg B. C., Graham D. Y., Estes M. K.* (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells, *J. Gen. Virol.*, **46**, 75.
2. *Bastardo J. W., Holmes I. H.* (1980). Attachment of SA 11 rotavirus to erythrocyte receptors, *Infect. Immun.*, **29**, 1134.
3. *Bernstein J. M., Hruska J. F.* (1981). Characterization of RNA polymerase products of Nebraska calf diarrhea virus and SA 11 rotavirus, *J. Virol.*, **37**, 1071.
4. *Bordon E. C., Shope R. E., Murphy F. A.* (1971). Physiochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses, to blue-tongue virus—a new taxonomic group: physiochemical and serological studies, *J. Gen. Virol.*, **13**, 261.
5. *Borsa J., Sargent M. D., Lievaart P. A., Copps T. P.* (1981). Reovirus: evidence for a second step in the intracellular uncoating and transcriptase activation process, *Virology*, **111**, 191.
6. *Chang C.-T., Zweerink H. J.* (1971). Fate of parental reovirus in infected cells, *Virology*, **46**, 544.

7. Clark S. M., Roth J. R., Clark M. L., Barnett B. B., Spendlove R. S. (1981). Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement, *J. Virol.*, **39**, 816.
8. Cohen J., Dubos P. (1979). Cell free transcription and translation of rotavirus RNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 791.
9. Cromack A. S., Blue J. L., Gratzek J. B. (1971). A quantitative ultrastructural study of the development of blue-tongue virus in Madin-Darby bovine kidney cells, *J. Gen. Virol.*, **13**, 229.
10. Dales S. (1963). Association between the spindle apparatus and reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 268.
11. Drayna D., Fields B. N. (1982). Activation and characterization of the reovirus transcriptase: genetic analysis, *J. Virol.*, **41**, 110.
12. Drayna D., Fields B. N. (1982). Biochemical studies on the mechanism of chemical and physical interaction of reovirus, *J. Gen. Virol.*, **63**, 161.
13. Espejo R. T., Lopez S., Arias C. (1981). Structural polypeptides of simian rotavirus SA 11 and the effect of trypsin, *J. Virol.*, **37**, 156.
14. Estes M. K., Graham D. Y., Mason B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms, *J. Virol.*, **39**, 879.
15. Estes M. K., Graham D. Y., Smith E. M., Gerba C. P. (1979). Rotavirus stability and inactivation, *J. Gen. Virol.*, **43**, 403.
16. Flewett T. H., Woode G. N. (1978). The rotaviruses, *Arch. Virol.*, **57**, 1.
17. Francki R. I. B., Boccardo G. (1983). The plant Reoviridae. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 505—563, Plenum, New York.
18. Furuichi Y., Shatkin A. J. (1977). 5'-Termini of reovirus mRNA: ability of viral cores to form caps post-transcriptionally, *Virology*, **77**, 566.
19. Deleted on proof.
20. Gorman B. M., Taylor J., Walker P. J. (1983). Orbiviruses. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 287—357, Plenum, New York.
21. Holmes I. H. (1983). Rotaviruses. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 359—423, Plenum, New York.
22. Holmes I. H., Rodger S. M., Schnagl R. D., Ruck B. J., Gust I. D., Bishop R. F., Barnes G. L. (1976). Is lactase the receptor and uncoating enzyme for infantile enteritis (rota) viruses? *Lancet*, **1**, 1387.
23. Holmes I. H., Ruck B. J., Bishop R. F., Davidson G. P. (1975). Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology, *J. Virol.*, **16**, 937.
24. Huismans H., Els H. J. (1979). Characterization of the microtubules associated with the replication of 3 different orbiviruses, *Virology*, **92**, 397.
25. Huismans H., Verwoerd D. W. (1973). Control of transcription during the expression of the bluetongue virus genome, *Virology*, **52**, 81.
26. Joklik W. K. (1974). Reproduction of reoviridae. In: *Comprehensive Virology*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, p. 231, Plenum, NY.
27. Joklik W. K. (1981). Structure and function of the reovirus genome, *Microbiol. Rev.*, **45**, 483.
28. Joklik W. K. (1983). The members of the family Reoviridae. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 1—7, Plenum, New York.
29. Deleted on proof.
30. Lee P. W. K., Hayes E. C., Joklik W. K. (1981). Protein $\sigma 1$ is the reovirus cell attachment protein, *Virology*, **108**, 156.
31. Matthews R. E. F. (1979). The classification and nomenclature of viruses, *Intervirology*, **11**, 133.
32. McCrae M. A., Faulkner-Valle G. P. (1981). Molecular biology of rotaviruses, *J. Virol.*, **39**, 490.
33. Morgan E. M., Kingsbury D. W. (1980). Reovirus enzymes that modify messenger RNA are inhibited by perturbation of the lambda proteins, *Virology*, **113**, 565.
34. Newman J. F. F., Brown F., Bridger J. C., Woode G. N. (1975). Characterization of a rotavirus, *Nature*, **258**, 631.

35. *Nonoyama M., Millward S., Graham A. F.* (1974). Control of transcription of the reovirus genome, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 373.
36. *Palmer E. L., Martin E. L.* (1977). The fine structure of the capsid of reovirus type 3, *Virology*, **76**, 109.
37. *Payne C. C., Meriens P. P. C.* (1983). Cytoplasmic polyhedrosis virus. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 425—504, Plenum, New York.
38. *Pearson G. R., McNulty M. S.* (1979). Ultrastructural changes in small intestinal epithelium of neonatal pigs infected with pig rotavirus, *Arch. Virol.*, **59**, 127.
39. *Petrie B. L., Graham D. Y., Estes M. K.* (1981). Identification of rotavirus particle types, *Intervirology*, **16**, 20.
40. *Rodger S. M., Schnagl R. D., Holmes I. H.* (1975). Biochemical and biophysical characteristics of diarrhea viruses of human and calf origin, *J. Virol.*, **16**, 1229.
41. *Sabin A. B.* (1959). Reoviruses, *Science*, **130**, 1387.
42. *Sharpe A. H., Chen L. B., Fields B. N.* (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells, *Virology*, **120**, 399.
43. *Shatkin A. J., Kozak M.* (1983). Biochemical aspects of reovirus transcription and translation. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 79—106, Plenum, New York.
44. *Shatkin A. J., Sipe J. D., Loh P. C.* (1968). Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Virol.*, **2**, 986.
45. *Shirley J. A., Beards G. M., Thouless M. E., Flewett T. H.* (1981). The influence of divalent cations on the stability of human rotaviruses, *Arch. Virol.*, **67**, 1.
46. *Silverstein S. C., Dales S.* (1968). The penetration of reovirus RNA and initiation of its genetic function in L-strain fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **36**, 197.
47. *Silverstein S. C., Astell C., Levin D. H., Schonberg M., Acs G.* (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vivo, *Virology*, **47**, 797.
48. *Smith R. E., Zweekink H. J., Joklik W. K.* (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3, *Virology*, **39**, 791.
49. *Tsai K.-S., Karstad L.* (1970). Epizootic hemorrhagic disease virus of deer: an electron microscopic study, *Can. J. Microbiol.*, **16**, 427.
50. Deleted on proof.
51. *Verwoerd D. W., Els H. J., deVilliers E.-M., Huismans H.* (1972). Structure of the bluetongue virus capsid, *J. Virol.*, **10**, 783.
52. *Verwoerd D. W., Huismans H., Erasmus B. J.* (1979). Orbiviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 14, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 285—345, Plenum, New York.
53. *Verwoerd D. W., Louw H., Oellermann R. A.* (1970). Characterization of bluetongue virus ribonucleic acid, *J. Virol.*, **5**, 1.
54. *Weiner H. L., Ault K. A., Fields B. N.* (1980). Interaction of reovirus with cell surface receptors. I. Murine and human lymphocytes have a receptor for the hemagglutinin of reovirus type 3, *J. Immunol.*, **124**, 2143.
55. *Weiner H. L., Drayna D., Averill D. R., Jr., Fields B. N.* (1977). Molecular basis of reovirus virulence: role of the S1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5744.
56. *Weiner H. L., Powers M. L., Fields B. N.* (1980). Absolute linkage of virulence and central nervous system tropism of reoviruses to viral hemagglutinin, *J. Infect. Dis.*, **141**, 609.
57. *Weiner H. L., Ramig R. F., Mustoe T. A., Fields B. N.* (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus, *Virology*, **86**, 581.
58. *Zarbl H., Millward S.* (1983). The reovirus multiplication cycle. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 107—196, Plenum, New York.

Репликация реовирусов

*Кеннет Л. Тайлер, Бернард Н. Филдс*¹

История вопроса

Вирусы, принадлежащие к этой группе, были выделены из кала детей в начале 50-х гг., но свое название «реовирусы» получили лишь в 1959 г. В 1953 г. Стэнли и др. [306] описали вирус, выделенный из кала детей, который они называли вирусом гепатоэнцефаломиелимита (HEV). Сходный изолят вируса был получен через четыре года в Голландии также из кала детей [318]. Ни в одном случае не было выявлено связи вируса с каким-либо заболеванием. Другие изоляты были получены из кала здоровых детей, детей, больных диареей, а также членов семьи со стеаторейным энтеритом. Один из выделенных вирусов стал прототипом группы ЕСНО-10 [233]. Эти вирусы отнесли к группе ЕСНО-10, поскольку их выделили из кишечника; они не были связаны с каким-либо заболеванием и хорошо размножались в культуре клеток почек обезьян, приводя к выраженному цитопатическому эффекту (ЦПЭ). Первоначально считали, что полученные изоляты непатогенны для новорожденных мышей [247]; это послужило основным критерием отличия вирусов группы ЕСНО от других энтеровирусов.

Однако скоро стало ясно, что вирусы группы ЕСНО-10 отличаются от других эховирусов некоторыми важными свойствами, среди них — размер вирионов, патогенность для животных, особенности ЦПЭ и способность к гемагглютинации. Фильтрование вирусов ЕСНО-10 через мембранные фильтры показало, что они в пять раз крупнее других эховирусов, полиовируса и вируса Коксаки [248]. Некоторые штаммы были патогенны для новорожденных мышей и вызывали поражение центральной нервной системы (ЦНС), печени и сердца [61, 248]. Для ЕСНО-10 характерен специфический тип ЦПЭ, сопровождающийся формирова-

¹ *Kenneth L. Tyler, Bernard N. Fields*, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.

нием внутриклеточных включений. Они способны также заражать первичные клеточные культуры, нечувствительные к другим эховирусам. Наконец, ЕСНО-10 вызывают агглютинацию эритроцитов группы О человека, причем эта реакция предотвращается предварительной обработкой эритроцитов периодатом натрия [247].

В 1959 г. Сэбин предложил выделить ЕСНО-10 в новую группу — реовирусы (от англ. *reovirus* — *respiratory enteric orphan viruses*). Она имеет следующие отличительные особенности: размер вириона около 75 нм; характерный ЦПЭ в культуре клеток обезьян (формирование включений); патогенность для новорожденных, но не для взрослых мышей; способность к гематглютинации эритроцитов группы О человека.

К этой же группе был отнесен ряд вирусов, выделенных в 50-х гг. от макаков-резусов (SV4, SV12, SV22, SV28 и SV59) [239, 247].

Правильность выделения специальной группы реовирусов стала очевидной, когда в начале 60-х гг. обнаружили уникальные особенности структуры реовирусной РНК. Сначала заметили, что при окрашивании клеток, зараженных реовирусами, акридиновым оранжевым наблюдается флуоресценция в зеленой области спектра (ортохроматическая), а не в оранжевой (метахроматическая), характерной для одноцепочечной РНК. Акридиновый оранжевый обладает высоким сродством к одноцепочечным нуклеиновым кислотам и окрашивает их метахроматически. Поскольку к тому времени уже было известно, что реовирусы содержат РНК, был сделан вывод, что эта РНК двухцепочечная [107]. Дальнейшие исследования показали, что реовирусная РНК состоит из комплементарных цепей, образующих двойную спираль [102, 157]. Для нее характерны высокая температура плавления и малый температурный интервал денатурации, устойчивость к панкреатической рибонуклеазе и иная, чем у одноцепочечной РНК, плавающая плотность. Определение нуклеотидного состава реовирусной РНК показало, что она содержит одинаковое число пуриновых и пиримидиновых оснований. Двухцепочечный характер реовирусной РНК был подтвержден также данными рентгеноструктурного анализа [16, 102].

Другая отличительная особенность реовирусной РНК заключается в том, что она представлена несколькими сегментами. Сегментированность реовирусного генома была впервые установлена при электронно-микроскопических исследованиях, которые выявили три класса двухцепочечной РНК (дцРНК), различающиеся по размеру [105, 319]. Наличие этих классов [большой (L), средней (M) и малый (S)] было подтверждено результатами центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [28,

259] и электрофореза в полиакриламидном геле [331]. Последний метод позволил идентифицировать у реовирусов млекопитающих 10 разных сегментов дцРНК [226].

Вирусы

Классификация

Реовирусы млекопитающих (ортореовирусы) относятся к одному из шести родов семейства *Reoviridae*. Три других рода (циповирусы, фитореовирусы и фидживирусы) объединяют агенты, патогенные только для насекомых и растений. Представители двух остальных родов (ротавирусы и орбивирусы) заражают широкий круг млекопитающих, включая человека, и других позвоночных.

Основными отличительными свойствами реовирусов является наличие сегментированного двухцепочечного РНК-генома, а также некоторые особенности репликации и физико-химических свойств (табл. 20.1). Все эти особенности подробно рассмотре-

Таблица 20.1. Структура и физико-химические свойства реовирусов

Диаметр ~ 75 нм
Икосаэдрическая форма
Не имеют внешней оболочки
Имеют наружный и внутренний капсиды
Устойчивы к органическим растворителям
Геном
Представлен десятью сегментами дцРНК
С каждого сегмента считывается уникальная мРНК
Репликация
После заражения не происходит раздевания (удаляется только наружный капсид)
В вирионе содержатся все ферменты, необходимые для транскрипции дцРНК
Весь процесс репликации осуществляется в цитоплазме

ны в последующих разделах настоящей главы. Рота- и орбивирусы по размеру близки к реовирусам, но отличаются от них строением субъединиц (капсомеров), формирующих внутреннюю и наружную белковые оболочки. Эти отличия отражены и в названиях: у орбивирусов капсомеры имеют форму кольца (*orbis* — кольцо), ротавирусы напоминают по форме колесо

(rota — колесо). Все они содержат сегментированный двух-цепочечный РНК-геном, причем у рео- и орбивирусов число сегментов равно 10, а у ротавирусов — 11.

Эта глава посвящена реовирусам млекопитающих. Здесь рассмотрены основные особенности их морфологии, физико-химических свойств, репликации, патогенеза, эпидемиологии и генетики. Аналогичные сведения о рота- и орбивирусах можно найти в литературе.

Реовирусы широко распространены в природе. Они выделены от шимпанзе, макаков, африканских мартышек (*Cercopithecus*), коров, мышей, птиц и даже насекомых, а антитела к реовирусам обнаружены у еще более широкого круга животных: собак, кошек, кроликов, крыс, лошадей, свиней, овец, верблюдов, кур и других птиц, рептилий, рыб и 39 видов сумчатых [127, 240, 276, 298, 308]. Из проверенных животных только у китов и однопроходных не обнаружены ни вирус, ни антитела к нему [298]. Вирус найден также в воде проточных и стоячих водоемов и в сточных водах [3, 238, 298].

Все реовирусы млекопитающих содержат одинаковый комплекссвязывающий антиген [247]. По результатам реакций нейтрализации и торможения гемагглютинации выделяют три родственных серотипа реовирусов [239, 240, 247]. Прототипным реовирусом типа 1 стал вирус ЕСНО-10 (штамм Lang), типа 2 — вирус, выделенный от ребенка с диареей (штамм Jones), типа 3 — вирусы, выделенные от ребенка с диареей (штамм Dea-ging) и больного с инфекцией верхних дыхательных путей (штамм Abney) [239, 247]. По данным гибридизации РНК вирусы серотипов 1 и 3 гомологичны на 70%, а степень гомологии между ними и вирусами серотипа 2 составляет лишь 10 % [91, 180]. Вирусы всех трех серотипов имеют сходную морфологию, однако их гомологичные гены и соответствующие им белки несколько различаются по электрофоретической подвижности [232, 258].

Ротавирусы кур, индюков, уток и других птиц дают перекрестные реакции со всеми серотипами реовирусов млекопитающих [62]. Всего выделено 77 штаммов реовирусов птиц. Все они дают перекрестные реакции по тесту связывания комплемента и преципитации в агаре и разделяются на пять серотипов по результатам реакции нейтрализации [142, 143].

Реовирусы птиц и млекопитающих различаются по некоторым важным биологическим свойствам. Так, реовирусы птиц вызывают слияние клеток в культуре, не обладают гемагглютинирующей активностью [143] и не растут в культуре клеток млекопитающих [100, 285, 286]. У вируса штамма Nelson Bay, выделенного от летучей собаки (*Petropus poliocephalus*), есть группоспецифический антиген реовирусов млекопитающих; вирус

способен размножаться в культуре клеток млекопитающих, вызывая их слияние [93, 94, 341].

Морфология

В составе вирионов реовирусов выделяют внутренний капсид, окружающий дцРНК из 10 сегментов (сердцевина), и наружный белковый слой (наружный капсид) [52, 135]. Сердцевина содержит белки, обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусной РНК. Белок $\lambda 2$ образует выросты («шипы»), тянущиеся от сердцевины до наружной поверхности вириона. Наружный капсид построен в основном из белков $\mu 1C$ и $\sigma 3$. Минорный компонент $\sigma 1$ расположен в непосредственной близости от шипов, образованных $\lambda 2$ [133, 159] (табл. 20.2; рис. 20.1). Свойства белков наружного капсида, сердцевины и неструктурных белков подробно описаны ниже.

Таблица 20.2. Белки реовирусов и их локализация в вирионе ¹⁾

Полипептид	Локализация
$\lambda 1$	Сердцевина
$\lambda 3$	»
$\mu 2$	»
$\sigma 2$	»
$\lambda 2$	Шипы
$\mu 1$	Сердцевина
$\mu 1C$	Наружный капсид
$\sigma 3$	» »
$\sigma 1$	» »
μNS	Неструктурный
σNS	»

¹⁾ Из работы [76a], с некоторыми изменениями.

Наружный капсид

Наружный капсид имеет форму икосаэдра с 12 вершинами и осями симметрии 5-го, 3-го и 2-го порядков [189]. Диаметр вирионов в фиксированных для электронной микроскопии препаратах составляет 76 нм [175], диаметр же гидратированных частиц — 96,4 нм [114].

Наружный капсид состоит из субъединиц (капсомеров). Их точное число и взаимное расположение определить пока не

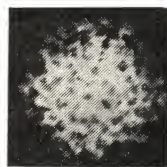
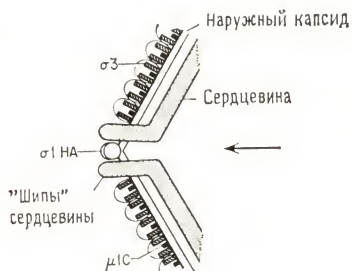


Рис. 20.1. Поверхностные белки наружного капсида реовирусов (из работы [76a] с разрешения авторов).

удалось. Примерные оценки дают цифры 92 [320], 122—127 [133] и 180 [321].

Согласно большинству данных, капсомеры представлены гексагональными или пентагональными единицами, состоящими соответственно из шести или пяти клиновидных субъединиц [215, 320, 321]. Предполагают, что диаметр гексагональных единиц равен 18—20 нм, а в центре их находится отверстие диаметром 4—6 нм [12, 215]. Субъединицы капсомеров в свою очередь состоят из трех более мелких субъединиц [215]. Существует и альтернативная модель, согласно которой капсомеры имеют форму усеченной пирамиды или цилиндра диаметром 9 нм [175].

Сердцевина и шипы

Сердцевина вириона, как и наружный капсид, имеет икосаэдрическую форму. Диаметр сердцевины в негидратированных препаратах составляет 52 нм [175], а в гидратированных — 70 нм [114]. Сердцевина составлена из субъединиц диаметром 4 нм [175]. Точное их число неизвестно: к настоящему времени предложены две модели — 42- и 122-субъединичная [199, 175].

На каждой из 12 вершин икосаэдра расположены шипы диаметром 10 нм, которые на 5—6 нм выступают над его поверхностью (рис. 20.1) [175]. Эти шипы построены из пяти субъединиц белка $\lambda 2$ с мол. массой 140 К [228] (табл. 20.2). Моноклональные антитела к $\lambda 2$ реагируют с интактными вирионами; это говорит о том, что шипы экспонированы на поверхности вириона [118]. На фотографиях поверхности интактных вирионов в каждой из 12 вершин икосаэдра видны впячивания [215]. По всей видимости, эти впячивания соответствуют местам присоединения шипов сердцевины [133].

Физико-химические свойства

Плотность

Плавучая плотность интактных вирионов в градиенте CsCl составляет 1,36—1,41 г/мл (разброс, видимо, отражает некоторые различия в составе нуклеиновых кислот и в процедуре очистки вируса) [31, 74, 107, 209, 274, 283]. Плавучая плотность сердцевин равна 1,43 г/мл [74, 283]. В процессе очистки вируса получают около 10% пустых вирусных частиц, не содержащих нуклеиновых кислот. Их плавучая плотность составляет 1,28—1,30 г/мл, что существенно ниже соответствующих величин для интактных вирионов и сердцевин [74, 283].

Молекулярная масса

Молекулярную массу интактного вириона и сердцевин определяли исходя из значений относительных коэффициентов диффузии, равных соответственно $4,45 \cdot 10^{-8}$ и $6,11 \cdot 10^{-8}$ см²/с. Мол. масса вириона составляет $129,5 \cdot 10^6$, сердцевин — $52,3 \times 10^6$ [74]. Из них в вирионе $109 \cdot 10^6$ Да приходится на белки, а от $15 \cdot 10^6$ до $21,4 \cdot 10^6$ Да — на РНК [74, 264]. В сердцевине на долю белков приходится $37,3 \cdot 10^6$ Да, на долю РНК — $15 \cdot 10^6$ Да [74]. Следовательно, вирионы реовирусов на 85% состоят из белков и на 15% из РНК [107].

Чувствительность к физическим и химическим воздействиям

Наружный капсид чувствителен к различным физическим и химическим воздействиям. В гипотонических растворах разрушается капсомерная структура [12]. Протеазы (например, химотрипсин) [264, 283] и тиоцианат натрия разрушают наружный капсид. Сердцевина же очень стабильна и устойчива к обработке мочевиной, гуанидином, диметилформамидом, диметилсульфоксидом (ДМСО), додецилсульфатом натрия (ДСН) в умеренных концентрациях [133]. Она устойчива также к действию протеаз [264, 283]. Поскольку реовирусы не содержат липидов, они не разрушаются при обработке органическими растворителями, например эфиром [107, 247, 298]. Вирионы устойчивы к действию 1%-ной перекиси водорода, 1%-ного фенола, 3%-ного формальдегида; они стабильны в широком интервале значений pH и температуры [236, 288, 298, 325].

В табл. 20.3 представлены результаты изучения механизма действия различных химических и физических инактивирующих агентов. При обработке реовирусов типа 2 щелочью (pH 11) из наружного капсида удаляется белок σ_1 , при этом на реовирусы

Таблица 20.3. Влияние на реовирусы различных химических воздействий ¹⁾

Воздействие	Ген, определяющий чувствительность	Изменения свойств вирионов	
		биохимические	ультраструктурные
pH 11	S1	Удаляется $\sigma 1$ без изменения плотности	Не обнаружены
Гуанидин	S1	Повышается плотность	Агрегация
1 %-ный ДСН	S4	Удаляется $\sigma 3$, повышается плотность	Изменение наружного капсида
55 °C	S4	Удаляется $\sigma 1$	Не обнаружены
1 %-ный фенол	M2	Не обнаружены	Агрегация
33 %-ный этанол	M2	» »	»

¹⁾ Данные взяты из работ [65] и [66] с разрешения авторов.

типа 1 щелочь не действует. Использование различных реассортантов вирусов показало, что чувствительность к pH 11 связана с функцией S1-сегмента двухцепочечной РНК. Вирусы, содержащие S1-сегмент типа 3, агрегируют при действии гуанидина в отличие от содержащих S1-сегмент типа 2. В присутствии 1 %-ного ДСН из наружного капсида реовирусов серотипов 1 и 2 удаляется $\sigma 3$. Чувствительность к ДСН и высокой температуре (55 °C), по-видимому, определяется геном S4. В растворе, содержащем 33 % этанола или 1 % фенола, происходит агрегация реовирусов типа 3; этот эффект детерминируется M2-сегментом РНК [65, 66]. Подобный анализ показывает, что различные физические и химические агенты действуют на определенные вирусные белки.

Реовирусы очень устойчивы в аэрозолях, особенно в условиях высокой относительной влажности [4].

Химические свойства вирионных РНК и белков

Двухцепочечная РНК

Мы уже говорили, что зараженные реовирусом клетки ортохроматически окрашиваются акридиновым оранжевым; это наблюдение привело к открытию двухцепочечного РНК-генома реовирусов [102, 107]. Об этом же свидетельствовали и все физико-химические свойства вирионной РНК: высокотемпературный и узкий профиль плавления [57, 103, 259], отличие плавучей плотности в градиенте Cs_2SO_4 от таковой для одноцепочечной РНК [124, 259], устойчивость к ДНКазе и РНКазе I [31, 103, 259], чувствительность к РНКазе III, фосфодиэстеразе и микрококко-

вой нуклеазе. Нуклеотидный состав РНК характеризовался эквимольным соотношением пуринов и пиримидинов ($G=C$; $A=U$) [103], что указывало на взаимную комплементарность двух цепей РНК.

Рентгеноструктурный анализ кристаллов РНК реовирусов показал, что эта РНК представляет собой правозакрученную двойную спираль с 10—11 нуклеотидами на виток и шагом 30 Å. Угол между плоскостями оснований и осью спирали составляет 75—80° [15, 16, 157].

дцРНК реовирусов сегментирована. Впервые на это указали данные электронной микроскопии [105, 319], которые вначале считали артефактом фиксации. Однако позже существование трех разных по размеру классов РНК было подтверждено результатами центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле [28, 31, 259, 266]. Коэффициенты седиментации, размер, молекулярные массы и число нуклеотидов в РНК каждого из трех классов представлены в табл. 20.4 [31, 231, 266, 319]. Данные о сегмен-

Таблица 20.4. Характеристика различных классов дцРНК

Класс РНК	Длина, нм	Коэффициент седиментации	Молекулярная масса · 10 ⁶	Число пар оснований
Большой	1,13	14S	2,7	4 500
Средний	0,66	12S	1,3—1,4	2 300
Малый	0,38	10,5S	0,6—0,8	1 200

тированности РНК-генома реовирусов подтверждены и в ряде других исследований, суммированных в табл. 20.5.

Таблица 20.5. Доказательства сегментированности генома реовирусов

Наблюдения	Источник данных
дцРНК не гибридизуются между собой	[28, 31]
С сегментов дцРНК транскрибируются специфические мРНК	[331, 333]
Обнаружено 20 3'-концов РНК на вирион	[190]
Все дцРНК содержат одинаковый 5'-концевой кэп (m ⁷ GpppGmpCUA...)	[21, 55, 88, 89, 191]

Используя электрофорез в полиакриламидном геле, удалось разделить реовирусную РНК на 10 сегментов: три больших, три средних и четыре малых [224, 227, 266]. Интактные вирионы со-

держат все 10 сегментов [266, 352]. Гомологичные сегменты РНК у вирусов разных серотипов несколько различаются по размерам, что крайне важно при типировании серотипов гибридных реовирусов [232, 258].

Сегменты реовирусной РНК состоят из колинеарных и полностью комплементарных друг другу плюс- и минус-цепей и не содержат одноцепочечных участков и «хвостов». Об этом свидетельствует устойчивость РНК к нуклеазе S1, специфичной к одноцепочечным нуклеиновым кислотам [201]. Плюс- и минус-цепи РНК можно разделить с помощью электрофореза в агарозе в присутствии 7 М мочевины [282].

До недавнего времени были известны лишь небольшие фрагменты последовательностей дцРНК реовирусов. Так, секвенирована последовательность из 50—60 нуклеотидов на 5'-конце всех мРНК реовируса типа 3, включая иницирующие кодоны [14, 146—150], т. е. весь участок связывания с 40S-субчастицей рибосомы. Известна последовательность 50—90 3'-концевых нуклеотидов всех мРНК реовируса типа 3 и у некоторых мРНК реовирусов типов 1 и 2 [14, 92, 170]. Все гены реовируса типа 3 (штамм Dearing) клонированы в плазмиде рBR322, и определена полная последовательность гена S2 [51]. Этот ген длиной 1329 нуклеотидов имеет первую открытую рамку считывания протяженностью в 331 кодон, которая заканчивается четырьмя стоп-кодонами TGA. Вторая, более короткая рамка расположена между 1020—1272-м нуклеотидами и заканчивается тремя TGA-кодонами. Длина первой рамки соответствует белку σ_2 с мол. массой 38 К, кодируемому геном S2 [51]. Белковый продукт второй рамки (85 кодонов) пока не идентифицирован.

Определена также полная последовательность сегмента S3 дцРНК реовируса типа 3, который кодирует белок σ_{NS} [237]. Его длина 1198 нуклеотидов, открытая рамка (366 кодонов) начинается с 28-го нуклеотида. Гомологии между S2 и S3 не выявлено. На основе аминокислотной последовательности σ_{NS} , определенной по первичной структуре РНК, построена модель вторичной структуры этого белка [237].

Олигонуклеотиды

20—30% реовирусной РНК составляет низкомолекулярная одноцепочечная РНК (оцРНК) [27—30, 264]. Подобная РНК обнаружена у реовирусов птиц и млекопитающих, а также в ряде хозяйских клеток [28, 29, 145, 264]. оцРНК разделяют на три класса [27, 32, 50b, 202, 203, 306]. Первый класс составляют олигоаденилаты длиной от 2 до 20 нуклеотидов, присутствующие в количестве около 850 копий на вирион и обычно составляющие примерно $\frac{1}{3}$ вирусной оцРНК [27, 202, 203]. 5'-концы всех олиго-

аденилатов моно-, ди- или трифосфорилированы. Олигоаденилаты синтезируются на поздних стадиях созревания вирионов, что, по-видимому, связано с работой вирусной транскриптазы в то время, когда ее K_m для АТР выше, чем для других нуклеотидов. При этом транскриптаза функционирует как oligo(A)-полимераза [32, 133, 203, 271]. Фактором, регулирующим транскриптазную и poly(A)-полимеразную активности, может быть белок наружного капсида $\mu 1C$. Расщепление $\mu 1C$ химотрипсином до фрагмента с мол. массой 69 К активирует транскриптазную [271, 307], а до фрагментов 64 К и 60 К — полимеразную [64, 348] активности.

$2/3$ олигонуклеотидов (2000 копий на вирион) состоят из 2—9 нуклеотидов и содержат на 5'-конце G [27, 32, 202]. Эти 5'-G-олигонуклеотиды также синтезируются в созревающем вирионе, а не в цитоплазме клетки [28]. Их 5'-концевые последовательности аналогичны 5'-концам реовирусных мРНК [116, 202], свидетельствуя о том, что они, вероятно, появились в результате abortивной транскрипции [14, 92, 146, 147, 170]. РНК-полимераза образует непрочный комплекс с участком инициации транскрипции, и значительное число транскриптов обрывается в самом начале [345, 349]. Таким образом, 5'-G-олигонуклеотиды — короткие abortивные транскрипты, накапливающиеся в вирионе на последнем этапе его созревания [348].

На долю олигонуклеотидов последнего класса приходится примерно 10% оцРНК (350 копий на вирион) [202]. Они представлены фрагментами из двух — восьми нуклеотидов с неизвестной последовательностью.

Если эти олигонуклеотиды и выполняют какую-то функцию, то она пока остается неизвестной. Обычно считают, что они располагаются внутри сердцевины вириона [50b, 171], хотя на этот счет есть и другие данные [114, 133]. Олигонуклеотиды высвобождаются из вириона при формировании субвирусной частицы, после чего кэпируются и метилируются [27, 50b, 133]. Показано, что олигонуклеотиды не нужны для продуктивной инфекции [50b].

Белки

К концу 60-х гг. было идентифицировано три класса реовирусных белков, сгруппированных по размерам [171, 283]. Большие (L) сегменты двухцепочечной РНК кодируют три больших белка (λ) с мол. массами от 135 К до 155 К. Три «среднеразмерных» РНК кодируют два структурных белка ($\mu 1$, $\mu 2$) и один неструктурный (μNS) с мол. массами от 70 К до 80 К. Четыре малых сегмента РНК кодируют три структурных белка ($\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$) и один неструктурный (σNS) с мол. массами от 34 К до 42 К (табл. 20.6).

Таблица 20.6. Белки реовирусов ¹⁾

Белок	Кодирующий сегмент генома	Молекулярная масса	Содержание в вирионе, %	Число молекул на вирион	Локализация
$\lambda 1$	L3	155 К	15	105	Сердцевина
$\lambda 2$	L2	140 К	11	90	»
$\lambda 3$	L1	135 К	≤ 2	≤ 12	»
$\mu 1$	M2	80 К	≤ 2	20	»
$\mu 1C$	M2	72 К	35	550	Наружный капсид
$\mu 2$	M1	70 К	≤ 2	≤ 12	Сердцевина
$\sigma 1$	S1	42 К	1	24	Наружный капсид
$\sigma 2$	S2	38 К	7	200	Сердцевина
$\sigma 3$	S4	34 К	28	900	Наружный капсид
μNS	M3	75 К	—	—	— (неструктурный)
σNS	S3	36 К	—	—	— (неструктурный)

¹⁾ Из работы [133] с разрешения авторов.

Вначале в полиакриламидных гелях удавалось выявить лишь часть из 10 реовирусных белков [171, 283]. Совершенствование техники электрофореза, включая применение диск-электрофореза в *трис*-глициновой системе, позволило идентифицировать все реовирусные белки [41, 57]. Определены последовательности аминокислот на С- и N-концах некоторых капсидных белков [220, 244].

Локализация полипептидов в вирионе установлена в экспериментах по иодированию поверхностных белков, а также при сравнении белкового состава сердцевин вирионов и интактных частиц. Обработка химотрипсином в определенных условиях приводит к частичному удалению наружного капсида [35, 38, 40, 130]. Белки $\sigma 3$, $\mu 1C$ и $\sigma 1$ удаляются последовательно в результате ступенчатого расщепления с образованием промежуточных продуктов. По-видимому, они являются компонентами наружного капсида. Именно в эти белки включается метка при иодировании интактных вирионов (но не сердцевины), и это еще раз свидетельствует об их поверхностной локализации [169, 179].

Белки наружного капсида

Белок $\sigma 1$. Наружный капсид реовируса построен в основном из трех белков: $\sigma 1$, $\sigma 3$ и $\mu 1C$. Как уже отмечалось в разд. «Морфология», белок $\lambda 2$, образующий шип на поверхности сердцевины, также входит в состав наружного капсида. По данным сте-

хиометрического анализа в одном вирионе реовируса присутствуют 24 молекулы белка $\sigma 1$ (мол. масса 42 К). Они расположены попарно в вершинах икосаэдра в непосредственной близости от $\lambda 2$ -поверхностных шипов. О пространственной сближенности $\sigma 1$ и $\lambda 2$ свидетельствуют данные о том, что моноклональные антитела против $\lambda 2$ блокируют связывание антител против $\sigma 1$ [160]. Моноклональные антитела против $\sigma 3$ и $\mu 1C$ не дают такого эффекта [160]. Белок $\sigma 1$ обладает рядом важных функций (см. ниже). Его наиболее важные свойства суммированы в табл. 20.7.

Таблица 20.7. Свойства белка $\sigma 1$

Свойства	Источник данных
Гемагглютинин	[338]
Антиген для образования вируснейтрализующих антител	[334]
Зависимая от Т-клеток гиперчувствительность замедленного типа	[110, 246, 336]
Образование супрессорных Т-клеток	[83, 110]
Образование цитотоксичных Т-лимфоцитов	[79—81, 165]
Тропность и поражаемые ткани	
ЦНС	[335, 337]
Гипофиз	[212]
Сетчатка	[314, 315]
Другие поражаемые ткани	
Скелетные мышцы	[316]
Взаимодействие с микротрубочками клетки-хозяина	[19, 257]
Подавление репликации клеточной ДНК	[254]

Использование моноклональных антител против $\sigma 1$ позволило выявить в составе этого белка несколько эпитопов или доменов [48, 159, 294]. Таким же способом были определены биологические функции разных доменов $\sigma 1$. Результаты исследования способности реовирусов к гемагглютинации предполагают, что $\sigma 1$ гликозилирован [95, 163, 164], но прямые подтверждения этому отсутствуют [112, 152].

$\mu 1C$ и $\sigma 3$. Стехиометрический анализ белков $\mu 1C$ и $\sigma 3$ показал, что на две молекулы $\sigma 3$ приходится одна молекула $\mu 1C$. Свободные $\mu 1C$ и $\sigma 3$ спонтанно формируют комплексы друг с другом [123]. $\mu 1C$ (мол. масса 72 К) образуется в результате отщепления фрагмента с мол. массой 8 К от N-конца белка $\mu 1$ (мол. масса 80 К). В зараженной клетке около 90% свободного белка находится в нерасщепленной форме $\mu 1$, в то время как 95% белка, связанного с $\sigma 3$, представляет собой белок $\mu 1C$; это означает, что расщепление скорее всего происходит при формировании комплекса $\mu 1$ с $\sigma 3$ [159]. Предполагается, что 2—4%

молекул $\mu 1C$ гликозилированы [152], а некоторые из них, возможно, и полиаденилированы и/или ADP-рибозилированы [50, 50а, 133], но эти данные необходимо подтвердить. На поверхности вирионов $\mu 1C$ образуют димеры, связанные дисульфидными мостиками [283]. Возможно также, что $\mu 1C$ образует комплексы с $\sigma 3$, в которых на один димер $\mu 1C$ приходится четыре молекулы $\sigma 3$. Об этом свидетельствует получение моноклональных антител, которые преципитируют комплекс $\sigma 3-\mu 1C$, но не его компоненты [159].

Сравнение триптических гидролизатов белков $\mu 1C$, выделенных из разных штаммов реовирусов, показало, что эти белки весьма консервативны. Этим $\mu 1C$ отличается от $\sigma 1$ и $\sigma 3$, в которых есть как консервативные, так и переменные участки [97, 98].

Белок $\mu 1C$ выполняет ряд важных биологических функций (табл. 20.8). Именно он определяет чувствительность наружного

Таблица 20.8. Свойства белков $\mu 1C$ и $\sigma 3$

Свойства	Источник данных
Белок $\mu 1C$	
Определяет степень устойчивости наружного капсида к действию протеолитических ферментов	[245]
Определяет способность реовирусов заражать клетки кишечника и распространяться в ЦНС после перорального введения	[245]
Определяет различную вирулентность в пределах данного серотипа	[122]
Индукцирует толерантность после перорального введения	[246]
Белок $\sigma 3$	
Подавляет синтез клеточных РНК и белков	[255]
Ответствен за установление персистентной инфекции	[6]
Обладает сродством к дцРНК	[123]

капсида к протеолизу *in vitro* [245] и скорость потери инфекционности после обработки химотрипсином, играет ключевую роль и в определении способности реовируса заражать клетки кишечника после перорального введения и впоследствии поражать центральную нервную систему [245]. Различия в гене М2 и соответственно в белке $\mu 1C$ обуславливают различия в нейровирулентности разных штаммов реовирусов одного серотипа [122] (см. разд. «Патогенез»).

Белок $\sigma 3$ (мол. масса 34 К) вместе с $\mu 1C$ — это основные белки наружного капсида. На поверхности вириона находится примерно 900 молекул $\sigma 3$ и 450 молекул $\mu 1C$. С белком $\sigma 3$ тоже

связаны некоторые биологические функции. Исследования мутантов по гену этого белка (сегмент S4) показали, что его повреждения могут приводить к установлению персистентной инфекции в культуре ткани [6]. Удаление $\sigma 3$ или его изменение при раздвигании вириона позволяет вирусной транскриптазе синтезировать преимущественно полноразмерные мРНК, а не продукты абортивной транскрипции [17].

Белки сердцевин

Детальная структура главных белков сердцевин ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\sigma 2$) и минорных белков ($\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$) пока не определена. По-видимому, $\sigma 2$ (38 К) и $\lambda 1$ (155 К) образуют комплексы, в которых на две молекулы $\sigma 2$ приходится одна молекула $\lambda 1$ [133]. Белок $\sigma 2$ хуже иодируется в составе сердцевин, чем $\lambda 1$, что указывает на его внутреннюю локализацию [339]. Молекулы $\lambda 2$ образуют пентамерные комплексы (мол. масса 140 К), формируя шипы сердцевин [228]. Как мы уже говорили, такие шипы располагаются на каждой из 12 вершин икосаэдра. По-видимому, у 10% молекул $\lambda 2$ отщеплен фрагмент с мол. массой 15 К, в результате чего образуется белок $\lambda 2C$ [159]. Назначение подобной модификации неизвестно.

В состав сердцевин входит также менее чем по 20 молекул белков $\lambda 3$, $\mu 2$ и $\mu 1$ [41, 186]. Их точная локализация не установлена.

В вирусной сердцевине найден белок, названный Смитом [283] «компонент VIII». Возможно, этот пептид с мол. массой 8000 является продуктом отщепления N-концевого фрагмента $\mu 1$ при образовании $\mu 1C$ [133].

Функции основных и минорных белков сердцевин мало изучены. Возможно, белки $\lambda 1$ и $\lambda 2$ совместно формируют каталитический центр вирусной транскриптазы [198]. Ее компонентом может быть и белок $\lambda 3$ [64]. Другие детали вирусной репликации и роль в этом процессе белков сердцевин рассмотрены в разд. «Репликация».

Неструктурные белки

Анализ вирусных продуктов в цитоплазме зараженных клеток выявил по крайней мере два неструктурных вирусных полипептида: μNS (ранее обозначаемый $\mu 0$ и $\mu 4$) и σNS (ранее обозначаемый $\sigma 2A$) [57, 353]. Правда, в работе [41] описаны шесть неструктурных белков. 50% μNS (мол. масса 75 000) находится в форме μNSc , которая короче μNS на фрагмент с мол. массой 5000 [159].

Известна группа мутантов реовирусов с дефектами в гене S3,

который кодирует σ NS (см. разд. «Генетика»). Это *ts*-мутанты, неспособные синтезировать дцРНК при непермиссивной температуре. В пермиссивных же условиях они успешно синтезируют дцРНК, и эта способность сохраняется у них даже при переходе в непермиссивные условия. Возможно, функция σ NS необходима на ранних этапах вирусной репликации.

Белок σ NS обладает высоким сродством как к вирусной, так и к клеточной оцРНК [296]. При этом он специфически связывается с вполне определенными участками вирусных РНК, а также способен связываться с ДНК *in vitro* [268]. Как и в случае μ NS, функция σ NS, роль его связывания с нуклеиновыми кислотами остаются неизвестными.

Ферментативные активности

Компоненты вирионов и сердцевин реовирусов обладают несколькими типами ферментативной активности (табл. 20.9).

Таблица 20.9. Ферментативные активности реовирусов

Активность	Примечание	Источник данных
1. дцРНК-зависимая оцРНК-полимераза (транскриптаза, оцРНК-зависимая дцРНК-полимераза)		[20, 34, 101, 132, 133, 166, 265, 277]
2. Oligo(A)-полимераза	Возможно, идентична 1	[307]
3. Нуклеозидтрифосфат-фосфогидролаза (нуклеотидфосфогидролаза)	Кэпирующий фермент (см. табл. 20.11)	[36, 139]
3а. GTP-зависимый пирофосфатный обмен	Реакция, обратная 3; возможно, тот же фермент	[322]
4. Гуанилтрансфераза	Кэпирующий фермент (см. табл. 20.11)	[262, 86, 90]
5. Метилтрансфераза 1	Кэпирующий фермент (см. табл. 20.11)	[262, 75]
6. Метилтрансфераза 2	Возможно, клеточный фермент	[260, 262, 75]
7. Полинуклеотидпирофосфатаза		[279]
8. Протеинкиназа		[153]

Транскриптаза (РНК-зависимая РНК-полимераза). Транскриптаза реовирусов была впервые обнаружена в 1968 г. [34, 265], но до сих пор не выделена в растворимой форме. В составе вирионов этот фермент неактивен, но активируется при нагревании [34] или под действием химотрипсина [265].

Влияние нагревания и протеаз, вероятно, основано на удалении $\sigma 3$ и других белков наружного капсида, каким-то обра-

ции и способствует повышению стабильности мРНК [86, 87].

Как видно из табл. 20.10, кэпированные 5'-концы реовирусной мРНК состоят из остатка 7-метилгуанозина, связанного (5'—5') тремя фосфатными группами с гуаниновым основанием [88], за которым, как правило, следует цитозин. Гуанин метилирован по положению 2'О (реакция 5) [89]. Второй этап метилирования (2'-О-метилирование цитозина) может осуществляться клеточной цитоплазматической метилтрансферазой [156]. Возможно, некоторые реакции, представленные в табл. 20.10, катализируются одним ферментом. Предполагают, что белок $\lambda 1$ может быть гуанилтрансферазой (реакция 3) [348], а $\lambda 2$ — метилтрансферазой [348].

Другие виды ферментативной активности. В вирионах и сердцевинах реовирусов обнаружена нуклеозидтрифосфат-фосфогидролазная активность [36, 139, 322]. Она катализирует отщепление неорганического фосфата от различных нуклеотидов, предпочтительно от АТР. Этот же фермент отщепляет фосфатные группы от трифосфорилированных концов полинуклеотидов (нуклеотидфосфогидролаза, реакция 2 в табл. 20.10).

Кристэл и др. [153] обратили внимание на то, что, когда реовирус реплицируется в присутствии ортофосфата, часть сериновых остатков в белке $\mu 1C$ оказываются фосфорилированными. В таком случае реовирусы обладают и какой-то формой протеинкиназной активности.

В препаратах субвирусных частиц и в лизатах зараженных реовирусом клеток (но не в неинфицированных клетках) обнаружена полинуклеотид-пирофосфатазная активность [279, 348]. Она может быть обусловлена либо вирусным ферментом, либо активированным клеточным и, возможно, участвует в образовании монофосфорилированного 5'-конца некэпированной поздней реовирусной мРНК [348].

Обнаруженный GTP-зависимый обмен пирофосфатов, вероятно, представляет собой реакцию, обратную катализируемой нуклеозидтрифосфат-фосфогидролазой, и, по-видимому, осуществляется тем же ферментом [322].

Определение концентрации вируса и очистка

Бляшкообразование

Реовирусы вызывают цитопатический эффект (ЦПЭ) в культуре клеток KB, HeLa, BS/C-1, Vero, CV-1 и различных типов клеток обезьян [24]. Для титрования вируса по его способности образовывать бляшки, как правило, используют мышинные фибробласты L [85]. Суспензию клеток L в среде МЕМ (обычно

содержащей 5% сыворотки плода коровы и глутамин) высевают на пластиковые чашки с таким расчетом, чтобы клетки образовали плотный монослой после 12—24 ч инкубации (37°C, 5% CO₂). Избыток среды удаляют и добавляют серийные разведения тестируемых на реовирус проб. После 45—60 мин адсорбции при 37°C и в присутствии 5% CO₂ клетки покрывают слоем агара (один объем расплавленного агара, смешанный с одним объемом среды 199 двукратной концентрации). Через 72 ч добавляют следующий слой агара, а еще через 72 ч — третий, содержащий прижизненный краситель нейтральный красный (0,04%). Бляшки имеют вид округлых неокрашенных зон. Морфология бляшек зависит от серотипа вируса и клеточной культуры [184]. Так, бляшки, образуемые реовирусом типа 3, имеют 2—3 мм в диаметре, а у реовирусов типов 1 и 2 они мельче — 1—2 мм. Размер бляшек вирусов типа 1 увеличивается, если вместо 5%-ной сыворотки плода коровы использовать 0,2%-ный бычий сывороточный альбумин (Neibert, неопубликованные данные). Сходный эффект вызывает добавление к культуре химотрипсина и одновременное снижение концентрации сыворотки (для уменьшения действия сывороточных ингибиторов протеазы) [324].

Гемагглютинация

Реовирусы всех серотипов вызывают агглютинацию эритроцитов человека [47], но только вирусы типа 3 агглютинируют эритроциты быка [68]. Как показывают генетические исследования, гемагглютинином реовирусов является поверхностный белок $\sigma 1$ [338]. Характер гемагглютинации реассортантных реовирусов, полученных в результате смешанной инфекции вирусами типов 1 и 3, определяется природой гена S1. Вирусы, несущие ген S1 типа 3, агглютинируют эритроциты и человека, и быка, а несущие ген S1 типа 1 — только человека [338]. Пустые вирионы содержат вирусный гемагглютинин и способны агглютинировать эритроциты [84].

Очистка

Для получения очищенных препаратов вируса обычно используют суспензионные культуры клеток L. Клетки концентрируют осторожным центрифугированием (500—800 об/мин, 10 мин) до плотности 10⁷ клетка/мл в среде MEM или растворе Пака. При заражении используют вирус в концентрации 5—10 инфекционных единиц на клетку. Адсорбцию ведут в течение 1 ч при комнатной температуре или при 33°C. Если адсорбция проводится при 37°, выход вируса снижается [133, 283]. Затем суспензию разбавляют до концентрации 5·10⁵ клетка/мл и ин-

кубируют при 33 °С. Максимальный выход вируса достигается через 72—96 ч после заражения.

По завершении инкубации клетки разрушают с помощью ультразвука и последующей обработки детергентом. Можно использовать также гомогенизацию во фреоне [28, 31, 259, 283]. Для окончательной очистки обычно используют зональное скоростное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы (20—40%) [283], а затем равновесное центрифугирование в градиенте плотности CsCl. Центрифугирование в сахарозном градиенте можно и не проводить и наносить водную фазу после экстракции фреоном сразу на градиент CsCl. Для хорошей очистки достаточно провести центрифугирование в течение 3—12 ч при 23 000 об/мин в роторе Beckman SW27. Весь нанесенный материал разделяется на две полосы: верхнюю (1,30 г/мл, верхний компонент), содержащую пустые частицы, и нижнюю (1,36 г/мл), состоящую из интактных вирионов. Очищенный препарат (или препараты) отбирают и диализуют против буферного раствора следующего состава: 0,15 М NaCl, 0,015 М MgCl₂, 0,01 М трис, pH 7,4. Из суспензии, содержащей $2,5 \cdot 10^8$ клеток, удается получить 10^{13} — 10^{14} вирусных частиц.

Соотношение между числом частиц и числом бляшкообразующих единиц

Как показывает анализ соотношения между оптической плотностью суспензии вируса и содержанием вирусных белков, $D_{260}=1$ соответствует $2,1 \cdot 10^{12}$ вирусных частиц, или 185 нг белка [283]. Отношение числа частиц к числу бляшкообразующих единиц обычно составляет 50:1—200:1, хотя иногда удается получить величины 1:1—2:1, используя, например, активацию химотрипсином [291, 325].

Инактивация

При облучении УФ-светом реовирусы утрачивают инфекционность, хотя описаны и случаи реактивации [183, 234]. Инфекционность снижается и под действием некоторых красителей, например нейтрального красного [120].

Репликация

Адсорбция

Адсорбцию реовирусов обычно изучают, используя концентрированную суспензию клеток L (10^7 клетка/мл) в растворе Пака, содержащем 0,02 М Mg²⁺ и 1% сыворотки плода коровы.

В этих условиях процесс протекает довольно быстро: около 50% вируса адсорбируется за первые 15 мин инкубации, 60—80% — в течение часа [229, 269].

Скорость адсорбции при 4° и при 37°C почти не различается. При низкой температуре вирус не проникает в клетку до тех пор, пока температуру инкубационной смеси не повысят до 37°C. Таким образом, адсорбция при 4°C позволяет синхронизировать заражение [60, 269]. Подсчитано, что в оптимальных условиях на одной клетке могут адсорбироваться $5 \cdot 10^4$ вирионов с константой адсорбции $2,5 \cdot 10^{-9}$ см³/мин на 1 клетку [130, 131].

Проникновение вируса в клетку

Как показывают электронно-микроскопические исследования, проникновение вируса в клетку осуществляется путем фагоцитоза («виropексис») [13, 60, 269]. Отдельные частицы или группы частиц обнаруживаются внутри фагоцитарных вакуолей уже через 15 мин после проникновения [269]. Эти вакуоли мигрируют к центру клетки, где они сливаются с лизосомами. В течение часа после проникновения 80% всех вирусных частиц оказывается внутри лизосом [269].

Адсорбция и проникновение реовирусов, вероятно, идентичны процессу рецепторного эндоцитоза, который характерен для самых разных лигандов, включая липопroteины и гормоны. Во многих случаях лиганд, связанный со специфическим рецептором, мигрирует к определенным участкам клеточной мембраны («окаймленные ямки»), а затем оказывается внутри клетки в особых пузырьках, одетых белком клатрином (окаймленные клатрином пузырьки).

В случае реовирусов главную роль в их связывании с клеткой играет поверхностный белок $\sigma 1$ (см. разд. «Патогенез»). Природа клеточного рецептора реовирусов неизвестна. Все серотипы реовирусов конкурируют между собой за одни и те же рецепторы L-клеток [160] и, возможно, эритроцитов человека [47]. С другой стороны, с клетками эпендимы способны связываться только реовирусы типа 1 [310]. Неодинаковая тканевая тропность разных серотипов реовирусов определяется природой белка $\sigma 1$ и распределением его рецепторов на клетках различных тканей.

Реовирусы могут проникать в клетку-хозяина и другим путем. При обработке реовирусов химотрипсином удаляется значительное количество белков наружного капсида ($\sigma 1$, $\sigma 3$, $\mu 1C$) [35, 37, 38, 40]. Образующиеся при этом субвирусные частицы по-прежнему способны проникать в L-клетки; при этом они не попадают ни в окаймленные пузырьки, ни в лизосомы [37]. После проникновения в клетку транскриптаза таких частиц активируется и

начинается нормальный цикл инфекции [35, 37, 38, 40]. По данным работ [35, 40] *in vitro* белок $\sigma 1$ в субвирусных частицах отсутствует. Если это верно, то частицы могут проникать в клетки и каким-то другим, необычным путем, отличающимся от «рецепторного эндоцитоза»; значение этого второго пути инфекции остается неизвестным.

Разделение

Разделение вирусных частиц в лизосомах начинается через 20—30 мин после проникновения и завершается в течение 2—3 ч [54, 269]. Это пассивный процесс, он не связан с белковым синтезом [60, 272], но зависит от температуры. При 37°C разделение идет в три раза быстрее, чем при 20°, а при 4°C практически останавливается [269].

При разделении удаляется около 50% белков наружного капсида [54, 270—272], причем белки $\sigma 1$ и $\sigma 3$ удаляются почти полностью. От белка $\mu 1C$ отщепляется фрагмент с мол. массой 8000, после чего остается так называемый δ -белок (мол. масса 64 000) [54, 272].

Одинаковы ли последовательности стадий разделения реовируса в лизосомах и при обработке его *in vitro* химотрипсином, не вполне ясно [35, 38, 40]. В последнем случае при определенных условиях происходят последовательное удаление белков $\sigma 3$, $\mu 1C$ и $\sigma 1$ и активация вирусной транскриптазы в момент деградации $\mu 1C$ [130, 272].

Транскрипция

Часть раздетых вирусных частиц остается в лизосомах в течение всего цикла инфекции [37, 60, 269]. Сведения о том, какой вирус запускает инфекцию, — оставшийся в лизосомах или покинувший их, — противоречивы. Присутствие в лизосомах кислых фосфатаз и рибонуклеаз и отсутствие в них нуклеозидтрифосфатов делает «внутрилизосомную модель» маловероятной. Данные о том, что раздетые частицы могут проникать в клетки, минуя рецепторный путь, косвенно свидетельствуют в пользу того, что аналогичная возможность существует и для частиц внутри лизосом [37, 273, 348].

Основные свойства реовирус-ассоциированной транскриптазы (дцРНК-зависимой оцРНК-полимеразы) описаны выше. Интактные вирионы не синтезируют полноразмерных транскриптов, они способны лишь к синтезу олигонуклеотидов — продуктов abortивной транскрипции [345, 346]. Активация полноценной транскрипции требует предварительных изменений в наружном капсиде — удаления белка $\sigma 3$ и отщепления фрагмента от $\mu 1C$

с образованием белка δ [130]. Генетические исследования показывают, что ген L1, кодирующий белок $\lambda 3$, определяет оптимум рН реовирусной транскриптазы [64], а ген M2 (он кодирует белки $\mu 1$ — $\mu 1C$) — условия, в которых химотриптическое расщепление активирует транскриптазу [64]. Модификация или удаление сердцевинных шипов, образуемых белком $\lambda 2$, ведет к подавлению транскрипции [197, 339]. Транскриптазная реакция идет строго по консервативному механизму, и обе родительские цепи дцРНК остаются внутри раздетых субвирусных частиц; ни одна из них не обнаруживается среди продуктов транскрипции [20, 166, 250, 273, 274, 277]. Транскрибируются лишь минус-цепи всех десяти сегментов дцРНК реовирусов [20, 134, 261, 277]. Транскрипция идет до конца, в результате чего синтезируются полно-размерные копии каждого генного сегмента [20, 117, 125, 126, 262, 277]. Оценки скорости транскрипции сильно варьируют: от 2 до 60 нуклеотидов в 1 с [20, 24, 277]. Предполагается, что эти оценки относятся к скорости транскрипции непосредственно после инициации, элонгация же осуществляется медленнее [133], и именно она является лимитирующей стадией транскрипции [346, 349].

Кэпирующие ферменты активируются вместе с транскриптазой, но работают независимо от нее [86—90, 262, 346]. Последовательность реакций, ведущих к образованию кэпов, описана выше.

Транскрипция инициируется не сразу со всех сегментов дцРНК. Ранняя транскрипция начинается в родительских раздетых субвирусных частицах [54, 272] и ведет к появлению кэпированных мРНК, кодирующих белки $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\sigma 2$ и μNS . Ранние мРНК обнаруживаются через 2 ч после заражения; их концентрация достигает максимума к 6—8 ч и падает ниже минимального регистрируемого уровня к 12 ч [131, 269, 348, 351].

Транскрипция остальных сегментов дцРНК осуществляется в дочерних вирионах. Образующиеся при этом поздние мРНК неэкпированы [280, 281, 350]. Поздняя мРНК появляется спустя 4—6 ч после заражения, достигает максимального уровня к 12 ч, а затем ее количество снижается [154, 332, 333].

Точная последовательность этапов репликации и транскрипции до сих пор не установлена. Субвирусные частицы сначала, по-видимому, работают как «репликазные частицы», а вскоре после завершения синтеза дцРНК становятся «транскриптазными частицами». Репликация протекает асинхронно. Родительские субвирусные частицы содержат минус-РНК-матрицы, на которых синтезируются плюс-цепи, участвующие в репликации [78, 287]. Минус-цепь дцРНК синтезируется на матрице предварительно синтезированной плюс-цепи [2, 249, 250]. Процесс идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ и начинается от единствен-

Таблица 20.11. Частота трансляции и транскрипции реовирусных генов ¹⁾

Ген	Белок	Относительная частота транскрипции	Относительная частота трансляции
L1	$\lambda 3$	1	0,6
L2	$\lambda 2$	1	3
L3	$\lambda 1$	1	2
M1	$\mu 2$	3	0,6
M2	$\mu 1$	6	20
M3	μNS	10	10
S1	$\sigma 1$	10	1
S2	$\sigma 2$	10	4
S3	σNS	20	6
S4	$\sigma 3$	20	14

¹⁾ Из работы [132] с разрешения авторов.

ной точки [249]. Его инициация (но не элонгация) зависит от белкового синтеза [154, 262, 332, 333]. Синтезированная минус-цепь остается связанной с комплементарной плюс-цепью [249]. Вирусная репликаза обеспечивает лишь один раунд синтеза минус-цепи [351].

По-видимому, плюс-цепи сегментов дцРНК, предназначенные для репликации вирусного генома, появляются даже раньше, чем ранние экпированные мРНК [158, 208, 332]. Эти одноцепочечные транскрипты двухцепочечных сегментов L1, M3, S3 и S4 называют предданными мРНК [348]. Интересно отметить, что именно эти четыре гена — единственные транскрибирующиеся гены реовирусов птиц в непермиссивных для них клетках L [285]. Для инициации транскрипции остальных шести сегментов дцРНК необходим предварительный синтез вирусных белков, но не репликация вируса [64, 285, 287, 332]. В норме через 6 ч после заражения уже транскрибируются все сегменты дцРНК [208, 352]. Простейшее объяснение состоит в том, что вирусная транскриптаза способна транскрибировать лишь сегменты L1, M3, S3 и S4, а для транскрипции остальных требуется синтез одного из продуктов этих генов. Однако этому противоречат результаты исследования вирусной транскриптазы *in vitro*, согласно которым фермент способен транскрибировать все 10 сегментов [272]. Другая гипотеза предполагает, что существует хозяйский белок — репрессор транскрипции шести поздних генов и дерепрессия осуществляется одним из ранних продуктов вирусной трансляции [158, 208, 263, 348].

Хотя в интервале от 6 до 13 ч после заражения транскрибируются все сегменты дцРНК, число копий разных транскрип-

тов существенно различается (табл. 20.11). Наблюдается обратная корреляция между частотой транскрипции и размером сегмента [132, 352].

Формирование новых сегментов дцРНК происходит во вновь образующихся сердцевинах вирионов, где они и остаются [2]. В зараженных клетках никогда не обнаруживают ни свободных дцРНК, ни свободных минус-РНК. Каков механизм, обеспечивающий попадание в вирион ровно десяти разных сегментов дцРНК, — неизвестно. Предполагается, что в этом процессе участвует РНК-связывающий белок σ NS [106, 123]. Еще одним аргументом в пользу этого предположения являются особенности *ts*-мутантных вирусов, дефектных по гену S3, кодирующему σ NS. Они не способны синтезировать дцРНК при непермиссивной температуре [232a].

Трансляция

Вскоре после заражения реовирусом постепенно снижается синтез белков клетки-хозяина [69, 104] и нарастает синтез вирусных белков. К началу 10-го часа большинство синтезируемых белков — вирусные [319, 352].

Механизм доминирования вирус-специфической трансляции неизвестен. Клеточные мРНК, как и ранние вирусные РНК, экпированы. Все вирусные мРНК содержат на конце rrrG, который может быть экпирован [22] (табл. 20.10). В определенный момент инфекции происходит переключение трансляции с экпированных мРНК на неэкпированные [279]. В этой связи любопытно отметить, что экпированные мРНК не транслируются в бесклеточных экстрактах зараженных реовирусом клеток L [284].

Поскольку все поздние вирусные РНК неэкпированы, такое переключение ведет к их преимущественной трансляции. Механизм этого переключения неизвестен. Предполагали, что инактивируется клеточный экпсвязывающий белок, который необходим для начала трансляции экпированных мРНК [348]. Анти тела против этого белка подавляют синтез полипептидов с экпированных мРНК и не влияют на трансляцию неэкпированных [284]. С другой стороны, возможно, для трансляции неэкпированных мРНК необходим особый вирусный белок [348]. Следует заметить, что в одной из работ наблюдалась одновременная эффективная трансляция экпированных и неэкпированных мРНК в зараженных реовирусом клетках [63]. В чем причины различий результатов этой работы и других исследований — неясно.

В зараженных клетках реовирусная мРНК связана как с большими, так и с малыми полисомами. В составе больших полисом мРНК находится в комплексе с капсидными белками

(RNP-комплекс); мРНК малых полисом свободна от вирусных белков [329, 330].

Точное число полипептидов, синтезирующихся в зараженных клетках, неизвестно. Первые работы, в которых сообщалось о восьми видах полипептидов [28, 108, 109, 187, 188, 352, 353], были затем дополнены в результате применения диск-электрофореза высокого разрешения. Кросс и Филдс [57] обнаружили 11 полипептидов, один из которых ($\mu 1C$) является продуктом расщепления другого ($\mu 1$), а Бот и др. [41] — 16.

Для каждого из 10 сегментов реовирусной РНК четко идентифицированы только одна мРНК и один первичный продукт трансляции. Однако наличие альтернативных открытых рамок считывания в некоторых генах реовирусов позволяет полагать, что существуют и другие мРНК и белковые продукты. Выявлено восемь дискретных первичных структурных белков ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, $\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$) и два неструктурных (μNS и σNS). Некоторые из них расщепляются, что ведет к образованию дополнительных классов полипептидов. В частности, происходят следующие расщепления: $\mu NS \rightarrow \mu NSC$, $\mu 1 \rightarrow \mu 1C$, $\lambda 1 \rightarrow \lambda 1C$, $\lambda 2 \rightarrow \lambda 2C$. Как мы уже отмечали, еще одним источником полипептидов могут быть белки, которые синтезируются с альтернативных мРНК, использующих другие рамки считывания. Дальнейшие детали, касающиеся отдельных полипептидов реовирусов, можно найти в разд. «Вирусы».

Для каждого из сегментов дцРНК выявлена соответствующая мРНК [82, 131, 252] и идентифицирован белковый продукт как с помощью опытов по трансляции *in vitro* [167, 186], так и на основании генетического картирования [200a].

Количество каждого из синтезируемых белков зависит от нескольких факторов. Во-первых, как мы отмечали, скорости транскрипции разных сегментов дцРНК существенно различаются [132]. Это приводит к различиям в относительных количествах разных классов мРНК и в свою очередь — к различиям в количествах вирусных белков [158, 352]. Во-вторых, эффективность трансляции разных мРНК неодинакова [132]; это касается как зараженных клеток, так и бесклеточной системы трансляции [28, 108, 109, 167, 187, 188, 278, 281, 352, 353].

Различия в эффективности трансляции разных мРНК, вероятно, обусловлены наследуемыми особенностями их структуры [348]. мРНК различаются и по их способности конкурировать за компоненты аппарата трансляции [44, 45, 323, 348].

Сборка и освобождение вирионов

Подробности сборки реовирусов и их высвобождения из клетки изучены недостаточно. В зараженной клетке выявлены

различные типы субвирусных частиц с разной плавучей плотностью в CsCl и коэффициентом седиментации [194—196, 351, 354]. Сообщалось также об обнаружении незрелых вирионов в клетках, зараженных *ts*-мутантами групп В и G [78, 194].

Как мы уже говорили, репликация, по-видимому, заканчивается на ранних стадиях инфекции. Синтез дцРНК осуществляется в субвирусных частицах («репликазные частицы») с плотностью в CsCl 1,34 г/см³, которые содержат плюс-оцРНК и полимеразную активность, осуществляющую транскрипцию оцРНК с образованием дцРНК. Скорее всего, когда синтез дцРНК заканчивается, эти частицы претерпевают какие-то структурные изменения, после чего начинают активно синтезировать мРНК, кодирующие вирусные полипептиды («транскриптазные частицы»). Затем происходит самосборка вириона с образованием икосаэдрического наружного и внутреннего капсидов (см. разд. «Вирусы»). Механизм включения десяти сегментов дцРНК в формирующуюся сердцевину вириона пока не установлен. После лизиса из клетки высвобождаются зрелые вирусные частицы. Причины лизиса клеток также неизвестны.

Изменения, вызываемые вирусом в зараженных клетках

Образование включений и влияние на цитоскелет

В клетках, зараженных реовирусами, появляются характерные цитоплазматические включения, именуемые «вирусные фабрики» (рис. 20.2, А) [107]. Это хорошо различимые при фазовом контрастировании зернистые образования, которые скапливаются в цитоплазме, агрегируют и перемещаются к ядру. Затем из них формируются плотные перинуклеарные включения, увеличивающиеся в размере по ходу инфекции [107]. Динамика образования включений была подробно изучена в случае нейронов ЦНС животных, зараженных реовирусом типа 3 [178, 326]. Для этого фиксированные клетки окрашивали конго красным [178] или флоксинтартразином Лендрума [162]. На ранних стадиях заражения нейронные включения выглядят как мельчайшие гранулы, разбросанные по перикариону. Потом они увеличиваются в размерах, образуя дискретные округлые, овальные или продолговатые тельца. На поздних стадиях заражения эти тельца почти целиком заполняют цитоплазму и дендриты, оставляя свободным ядро — единственную различимую внутриклеточную структуру [178]. Образование включений замедляется при пониженной температуре (31 °C) [78]. Для каждой линии клеток характерна своя динамика формирования включений [78, 235].

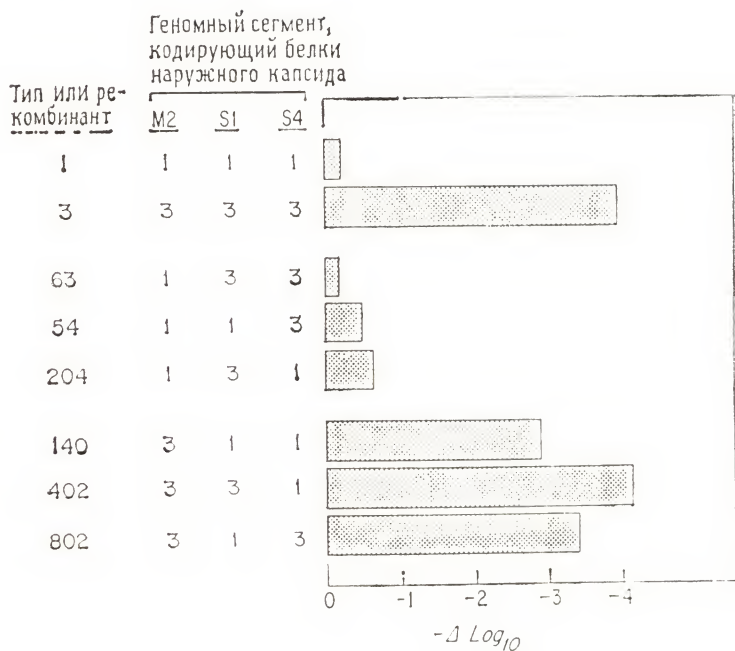


Рис. 20.2. А. Вирусные антигены в клетках CV-1 через 48 ч после заражения реовирусом типа 3. Клетки окрашивали кроличьей сывороткой против реовируса, а затем козьими антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуоресцеином. Цитоплазматические включения имеют вид многочисленных округлых белых пятен. Размер включений тем больше, чем ближе они расположены к ядру. Масштаб — 20 мкм. Б. Электронная микрофотография области клетки CV-1, зараженной реовирусом типа 3, которая содержит вирусные включения. Увеличение 5250. (Из работы [257] с разрешения авторов.)

Включения содержат днРНК [107, 270], вирусные полипептиды [78, 290], зрелые и незрелые вирусные частицы [13, 60, 107, 128, 188]. Последние часто образуют кристаллические скопления (рис. 20.2, Б) [13, 60, 78, 107, 128, 290]. В состав вирусных фабрик рибосомы не входят: для трансляции вирусные мРНК должны покинуть фабрики, а новосинтезированные полипептиды — возвращаться обратно для сборки вирионов.

Непосредственно через вирусные фабрики проходят микротрубочки [59, 257], покрытые вирусными белками [19]. Вирионы реовирусов связываются с микротрубочками *in vitro*, возможно с помощью белка σ1 [19]. Несмотря на это, трубочки не являются необходимыми для продуктивной инфекции (по крайней мере *in vitro*): обработка зараженных клеток колхицином не снижает выхода вируса [289]. При этом в клетках не образуются

характерные перинуклеарные включения, а вместо этого остаются мелкие периферические тельца [289].

По данным иммуноцитохимического анализа в зараженных реовирусами клетках наблюдается последовательное разрушение виментиновых промежуточных филаментов [257]. Пучки этих филаментов проходят между микротрубочек внутри вирусных фабрик и тесно связаны с вирионами [59, 257]. Предполагают, что виментиновые филаменты участвуют в организации фабрик и, следовательно, в репликации вируса [256, 257]. Именно повреждениями и реорганизацией промежуточных филаментов, возможно, и обусловлены изменения формы зараженных клеток, характерные для ЦПЭ реовирусов [256].

Изменения клеточного метаболизма, вызванные вирусом

Через 8—10 ч после заражения клеток реовирусом типа 3 наблюдается подавление синтеза ДНК [69—71, 104, 267], причем синтез блокируется на стадии инициации [70, 112, 113], поскольку не происходит ни заметной деградации ДНК, ни изменений в ДНК-полимеразе [70]. Морфологические изменения, коррелирующие с подавлением синтеза ДНК, заключаются в декомпактизации конденсированного хроматина в ядре, а затем в агрегации гетерохроматина и смещении его к периферии ядра [53].

Подавлять синтез ДНК способны и реовирусные частицы, инаktivированные УФ-светом, но ни «пустые» капсиды (верхний компонент градиента), ни сердцевины такого эффекта не вызывают [155, 267.] Вначале предполагали, что подавление синтеза ДНК связано с вирусными белками σ NS или σ 3. Для них обоих характерно высокое сродство к ДНК в определенных (но не во всех [123]) условиях *in vitro* [268]. Важный вклад в решение проблемы ингибирования синтеза ДНК внесли генетические исследования. Известно, что реовирус типа 3 подавляет синтез ДНК в клетках L, а типа 1 — нет. Это обстоятельство позволило картировать ген, ответственный за подавление, используя реассортанты реовирусов, которые содержали различные комбинации генов двух указанных реовирусов. Этот подход показал, что способность подавлять синтез ДНК связана с белком σ 1 (вирусный гемагглютинин), который кодируется геном S1 [254].

Реовирусы разных серотипов различаются по своей способности подавлять синтез клеточных РНК и белков [104, 154, 255, 352]. Так, вирус типа 2 ингибирует белковый синтез в монослое клеток L гораздо более эффективно, чем типов 1 и 3 (рис. 20.3) [255].

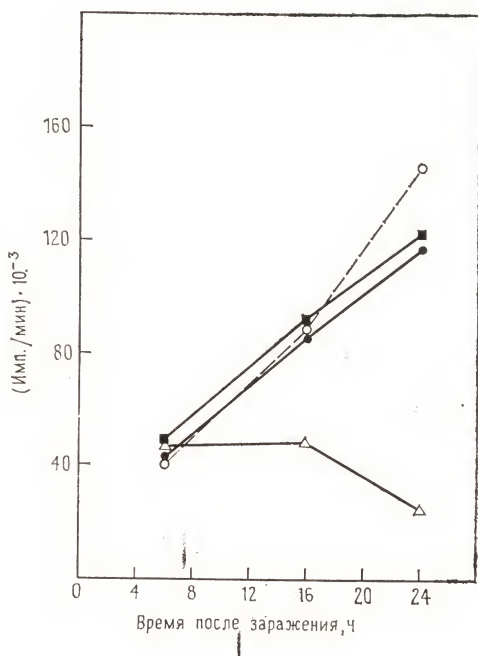


Рис. 20.3. Синтез белка в клетках линии L после заражения реовирусами типов 1, 2 и 3. L-клетки мыши (почти сплошной монослой) заражали с эффективностью 80 БОЕ на клетку реовирусами типа 1 (темные кружки), 2 (треугольники) и 3 (квадратики). Через 5, 16 и 24 ч после заражения клетки помещали в безметиониновую минимальную среду Игла, содержащую 1 мкКи/мл $[^{35}\text{S}]$ -метионина. Клетки инкубировали 0,5 ч при 37°C , после чего определяли включение метки. Контролем служил неинфицированный монослой L-клеток (светлые кружки). (Из работы [255] с разрешения авторов.)

Реовирус типа 2 подавляет также и синтез РНК. Этот эффект проявляется почти одновременно с подавлением белкового синтеза [255]. Действие вирусов типов 1 и 3 в этом случае выражено слабее. Изучение реассортантов реовирусов показало, что за подавление синтеза клеточных белков и РНК ответствен сегмент вирусной РНК S4, который кодирует белок $\sigma 3$ [255]. Механизм его действия неизвестен, хотя установлена способность $\sigma 3$ связываться с РНК. Возможно, наблюдаемый эффект обусловлен связыванием этого белка с клеточными рРНК, мРНК или тРНК [255]. Для его проявления необходима репликация вируса, а белок $\sigma 3$ должен присутствовать в заметных количествах [255].

Патогенез

Патогенность — это способность вируса вызывать заболевание. Патогенность проявляется в результате последовательных взаимодействий между вирусом и организмом хозяина. Основные этапы этих взаимодействий перечислены ниже, а затем обобщены в самостоятельных разделах. Различные стороны индуцированных вирусом повреждений клетки мы уже описывали.

Итак, патогенность реовирусов проявляется в результате

- заражения хозяина;
- первичной репликации;
- распространения вируса по организму;
- клеточной и тканевой тропности;
- иммунного ответа организма;
- повреждения клеток;
- персистентной инфекции.

Заражение хозяина

В природе реовирусы существуют в первую очередь как кишечные вирусы. В экспериментальных условиях заражение может осуществляться разными способами: путем введения инокулята в мозг, глаз, спинной мозг, внутримышечно, внутрибрюшинно, перорально, в кровоток (внутривенно). Патогенность кишечных вирусов исходно определяется их способностью выдерживать химические (кислота, желчь, пищеварительные ферменты) и иммунологические (секреторные иммуноглобулины класса А) воздействия среды желудочно-кишечного тракта. Реовирусы типов 1 и 3 ведут себя по-разному при пероральном введении мышатам-сосункам. Если реовирус типа 1 хорошо размножается в кишечнике, то титр вируса типа 3 резко падает. Способность эффективно размножаться в кишечнике сохраняют лишь те реассортанты, которые содержат сегмент РНК М2 типа 1. При этом природа остальных сегментов для проявления этого признака несущественна [245].

При изучении инфекционности реовирусов *in vitro* после обработки химотрипсином оказалось, что титры реовирусов типа 1 не падают в отличие от реовирусов типа 3, инфекционность которых уменьшается на четыре порядка. Резистентность реассортанта к химотрипсину также связана с природой сегмента РНК М2: вирусы, содержащие М2 типа 1, не теряют инфекционности после обработки химотрипсином, у вирусов же, содержащих М2 типа 3, инфекционность уменьшается на 3—4 порядка (рис. 20.4) [245].

Сегмент М2 кодирует белок $\mu 1/\mu 1C$, расположенный на поверхности вирионов. По данным генетических исследований именно он играет ключевую роль в определении способности реовируса размножаться в тканях кишечника после перорального введения и в устойчивости вируса к обработке протеазами. Хотя до сих пор нет прямых данных о том, что разная устойчивость реовирусов к кишечным протеазам *in vivo* коррелирует со способностью разных серотипов к размножению, эта возможность кажется весьма привлекательной.

После перорального введения реовирусы типов 1 и 3 связываются с клетками микроворсинок кишечника, покрывающими

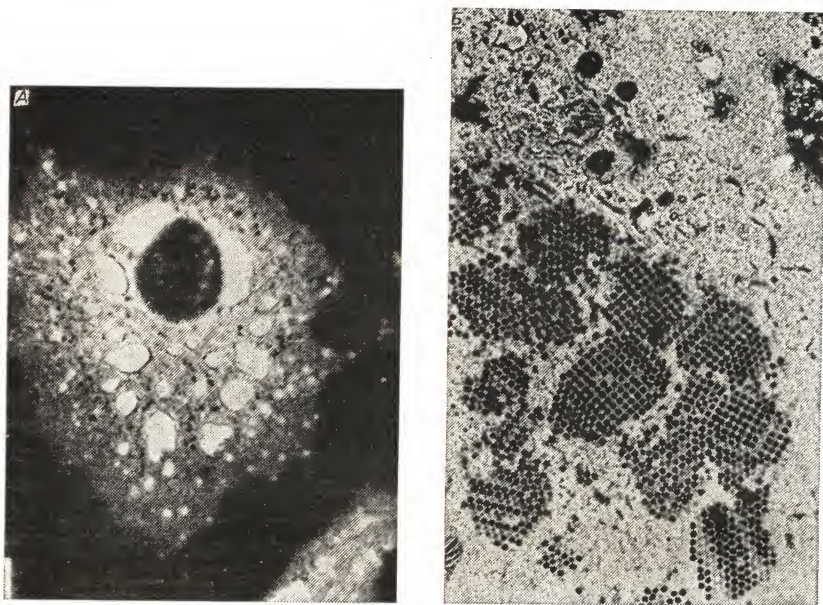


Рис. 20.4. Уменьшение титра различных штаммов вируса после обработки химотрипсином в присутствии Cs^+ . Указано происхождение сегментов генома, кодирующих три полипептида наружного капсида. (Из работы [245] с разрешения авторов.)

пейеровские бляшки [342, 343] (рис. 20.5). Эти клетки (М-клетки) представляют собой специализированные эпителиальные клетки, осуществляющие транспорт макромолекул из просвета кишечника в межклеточное пространство [33, 213, 214]. Реовирус типа 3 в отличие от вируса типа 1 способен также адсорбироваться на всасывающих клетках кишечника и проникать в них путем эндоцитоза [42, 342]. Реовирусы типов 1 и 3 после заражения последовательно обнаруживаются сначала на поверхности М-клеток, затем в составе внутриклеточных пузырьков, в межклеточном пространстве между М-клетками и мононуклеарными клетками слизистой и наконец на поверхности мононуклеарных клеток [342, 343]. М-клетки служат «транспортным средством» для переноса реовируса через слизистую кишечника внутрь пейеровских бляшек [343]. После перорального введения реовируса типа 1 наблюдается гиперплазия пейеровских бляшек, а затем инфекционный вирус появляется в брыжеечных лимфоузлах [141]. Клетки, аналогичные М-клеткам, обнаружены и в

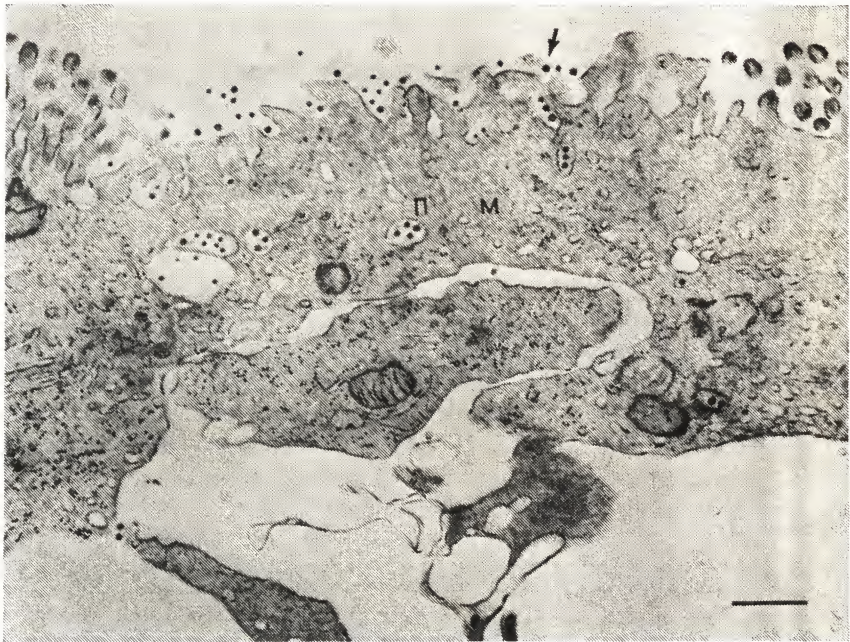


Рис. 20.5. Эпителий тонкого кишечника, покрывающий пейеровскую бляшку взрослой мыши С₃Н/Не₁. Через 30 мин после заражения реовирусом типа 1 вирионы обнаруживаются на поверхности (стрелка) и в пузырьках (П) М-клеток. К апикальной поверхности прилегающей всасывающей клетки (А) вирион не присоединяется. Увеличение 11350. (Из работы [343] с разрешения авторов).

других тканях, в частности в ассоциированной с бронхами лимфоидной ткани. Они могут служить воротами респираторной реовирусной инфекции [256].

Распространение по организму

Пути распространения

Вирусы могут распространяться по организму от места внедрения и начала репликации разными путями. Известны примеры инфекции через кровь, нервную ткань, лимфоидные клетки. Эта стадия патогенеза реовирусов изучена недостаточно. Скорее всего реовирусы могут начинать заражение разными путями.

Гематогенный путь

По предварительным данным реовирус типа 1 после внутривенного введения новорожденным мышам распространяется по разным тканям, включая печень, селезенку и мозг. Реовирус типа 3, по-видимому, не способен достигать большинства органов после внутривенного введения ([256]; Burstin, Fields, Byers, неопубликованные данные).

Лимфоидный путь

Реовирус типа 3 связывается с В- и Т-лимфоцитами человека [334a]. Генетический анализ показал, что это связывание осуществляется с помощью поверхностного белка $\sigma 1$ [334a]. Его функциональный смысл неизвестен: остается неясно, участвуют ли лимфоциты в распространении реовируса по организму *in vivo*.

Нервный путь

После внутримышечного введения реовируса типа 3 новорожденным мышам он в первую очередь и с наивысшим титром обнаруживается в том месте спинного мозга, которое иннервирует инъектированную мышцу (Tyler, Fields, 1983, неопубликованные данные). Эти наблюдения свидетельствуют (но не доказывают), что реовирус типа 3 может распространяться по нервам.

Генетика распространения инфекции

После перорального введения и первичного размножения в клетках кишечника реовирус типа 1 распространяется на ЦНС. У мышат-сосунков он заражает клетки эпендимы и вызывает эпендимит с последующей гидроцефалией [144, 178, 182, 226]. Реовирус типа 3 после перорального введения не обнаруживается в ЦНС в заметных количествах [245]. Генетический анализ показал, что способность реовируса достигать ЦНС в значительной степени определяется природой сегмента М2 дцРНК [245]. Пути распространения вируса от клеток кишечника до ЦНС пока не прослежены.

Установлено, что распространение реовирусной инфекции у десятидневных мышей от клеток кишечника (пейеровские бляшки и брыжеечные лимфоузлы) до селезенки контролируется S1-сегментом РНК [141]. Вероятно, распространение вируса контролируется многими генами, включая S1- и М2-сегменты, и зависит также от возраста животного и способа заражения.

Клеточная и тканевая тропность

Способность вируса заражать определенные типы клеток называют тропностью. В ее основе лежат разного рода взаимодействия между вирусом и клеткой. Например, в некоторых случаях вирус должен нести особый поверхностный белок для связывания с клеткой-мишенью, а клетка-хозяин должна иметь рецептор для связывания вируса. Далее, необходимо, чтобы все этапы репликации проходили правильно. Инфекция может завершаться гибелью клеток, хронической персистенцией вируса или не приводить ни к каким видимым изменениям клеток. Важно точно определить, какие из этих этапов вирус успешно преодолевает или, наоборот, на каком из них инфекция обрывается.

Белок $\sigma 1$ (вирусный гемагглютинин)

Различные комплексные генетические и биологические исследования показали, что поверхностный реовирусный полипептид $\sigma 1$ играет ключевую роль в присоединении вируса к клеткам различных тканей.

Реовирусы способны связываться с рецепторами на поверхности эритроцитов, вызывая их агглютинацию. Эритроциты человека агглютинируются всеми тремя серотипами реовирусов [47, 68], а эритроциты быка — только реовирусом типа 3 [68]. При изучении реассортантов, несущих различные комбинации сегментов РНК, установлено, что характер агглютинации определяется природой сегмента S1: реовирусы, несущие S1 типа 3, агглютинируют эритроциты и человека, и быка, а содержащие S1 типа 1 — только эритроциты человека. Другие сегменты РНК не влияют на проявление этого свойства реовирусов [338].

Внутримозговое введение реовируса типа 3 мышатам-сосункам ведет к проникновению вируса в нейроны и затем к развитию энцефалита с летальным исходом. Вирус типа 1 не заражает нейроны: он размножается в клетках эпендимы и приводит к эпендимиту, а затем к гидроцефалии [144, 178, 182, 221, 226]. Как показали исследования реассортантов, эти различия связаны с природой сегмента S1 [337] (рис. 20.6), который кодирует поверхностный белок $\sigma 1$.

После внутримозгового введения реовирус типа 3 распространяется в глаза, где заражает клетки зрительных ганглиев. В них появляется множество вирусных включений; титр вируса нарастает экспоненциально. Вирусы типа 1 плохо размножаются в тканях глаза после внутримозгового введения и не повреждают ганглиозных клеток. Анализ реассортантов показал, что способность к эффективной репликации в глазу и пораже-

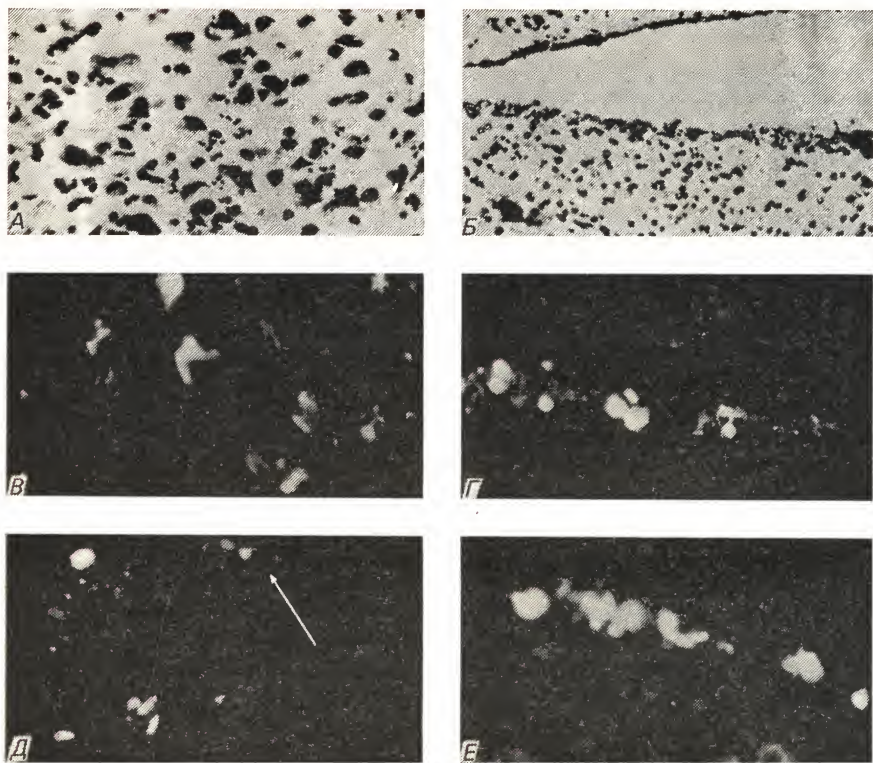


Рис. 20.6. Ткани мозга мышей, зараженных реовирусами типа 1 или 3 или клонами 1.NA3 или 3.NA1, рекомбинантными по одному сегменту (из работы [337] с разрешения авторов). А. Выраженный некроз нейронов височной доли мозга после заражения вирусом типа 3 и рекомбинантом 1.NA3. Окрашивание с помощью гематоксилина и эозина; $\times 400$. Б. Сильно увеличенный желудочек мозга с сохраненной архитектурой нейронов; заражение реовирусом типа 1 или рекомбинантом 3.NA1. Окрашивание гематоксилином и эозином; $\times 160$. В, Д. Вирусный антиген в паренхиме височной доли мозга. Заражение вирусом типа 3 либо рекомбинантом 1.NA3. Иммунофлуоресцентное окрашивание; $\times 630$. Стрелкой на рис. Д указано тело нейрона с выявляемым в нем вирусным антигеном, а также антиген в отростке аксона. Г, Е. Вирусный антиген в клетках эпендимы, выстилающих латеральные стенки полости желудочка. Такая картина наблюдается после заражения как вирусом типа 1, так и рекомбинантом 3.NA1. Иммунофлуоресцентное окрашивание; $\times 630$.

ние ганглиозных клеток — свойства, связанные с S1-сегментом РНК реовируса типа 3 [315].

Реовирус типа 1 может заражать клетки передней доли гипофиза мышат-сосунков. Вирусные частицы обнаруживаются в клетках — продуцентах гормона роста. Заражение этих клеток

приводит к снижению уровня циркулирующего гормона и появлению аутоантител к нему. У некоторых мышей с пораженным гипофизом развивается синдром карликовости, проявляющийся в малых размерах, маслянистой шерсти и стеаторее [212]. Реовирус типа 3 не заражает клеток передней доли гипофиза, однако может вызывать синдром карликовости [302, 304, 328] (см. ниже). И это свойство реовируса обусловлено геном S1 [212].

Внутримышечное введение реовируса типа 3 мышатам-сосункам приводит к некротическому миозиту, а вирус типа 1 вызывает при этом лишь легкое воспаление. Вирусы обоих типов дают высокие титры при размножении в мышцах. Характер повреждения скелетной мускулатуры определяется S1-сегментом вирусной РНК [316].

Есть несколько примеров, когда реовирусы типов 1 и 3 вызывают разные поражения одной и той же ткани, но эти различия не определяются сегментом S1. Внутрибрюшинное введение реовируса типа 3 сосункам приводит к поражению печени, проявляющемуся в развитии гепатита и обтурационной желтухи [216—218, 222, 300, 301], а вирус типа 1 не поражает печень. Генетические основы этих различий не установлены [23].

Реовирусы типов 1 и 3 способны заражать клетки поджелудочной железы [211, 212], а вирус типа 3 может инфицировать продуцирующие инсулин β -клетки в культуре. Пассирование вируса в этой системе ведет как к увеличению его титра, так и к повышению числа зараженных клеток [347].

Роль белка $\sigma 1$ в реовирусной инфекции исследовали также *in vitro*. Как мы отмечали, с помощью этого белка реовирус типа 3 связывается с В- и Т-лимфоцитами [337]. Природа клеточного рецептора для связывания реовирусов на этих клетках не установлена; известно лишь, что эта структура не связана с антигенами комплекса HLA: реовирус типа 3 способен связываться с клетками линии R1.E, лишенными антигенов главного комплекса гистосовместимости [256]. Обработка лимфоцитов, связавших реовирус, противовирусными антителами может привести к экзпигу реовирусных рецепторов. Изучение этого феномена позволило установить, что рецепторы реовируса не являются ни иммуноглобулинами, ни Fc-фрагментами, ни антигенами C3, Thy1 или H2 [72].

Определены количественные параметры связывания реовируса типа 3 с клетками гипофиза в культуре. Связывание ^{125}I -меченного вируса происходит быстро и стабильно. С одной клеткой связывается до 4000 вирионов с константой связывания $\sim 10^{-11}$ М [176].

Реовирус типа 1 в отличие от вируса типа 3 способен связываться *in vitro* с клетками эпандимы. Как показал анализ реассортантных вирусов, за это связывание ответствен сегмент S1

геномной РНК, кодирующий поверхностный белок $\sigma 1$ [310]. Это наблюдение является, пожалуй, лучшим примером корреляции поведения реовируса *in vitro* и *in vivo*: после внутримозгового введения мышатам-сосункам реовирус типа 1 в отличие от вируса типа 3 заражает клетки эпендимы и вызывает эпендимит.

Результаты исследований *in vivo* и *in vitro*, описанные выше, ясно указывают на важнейшую роль сегмента S1 и белка $\sigma 1$ в связывании и проникновении реовируса в клетку. Получение моноклональных антител к этому белку [48] позволило определить функции отдельных доменов или эпитопов $\sigma 1$. Выращивая реовирус типа 3 в присутствии моноклональных антител против главного нейтрализующего участка $\sigma 1$, можно получить клоны вируса, устойчивые к нейтрализации. Несколько таких вариантов охарактеризовано. Варианты А, F и К оказались существенно менее вирулентны, чем исходный штамм (табл. 20.12) [292—

Таблица 20.12. Нейровирулентность реовируса серотипа 3 (штамм Dearing) и НА-антигенных вариантов А, F и К¹

Инокулум (БОЕ)	Доля мышей (в %), выживших на 14-е сутки после заражения различными штаммами реовируса			
	Штамм Dearing	А	F	К
1·10	50	100	100	100
1·10 ²	0	100	100	100
1·10 ³	0	100	100	100
1·10 ⁴	НО	100	100	100
1·10 ⁵	НО	90	100	100
3·10 ⁵	НО	0	100	100
3·10 ⁶	НО	0	90	100
3·10 ⁷	НО	0	50	90
ЛД ₅₀	10	1,8·10 ⁵	3·10 ⁷	>3·10 ⁷

¹ Группы мышей линии CD (в возрасте 24—48 ч) заражали интрацеребрально различными дозами вируса и наблюдали в течение 14 сут. Животные в большинстве случаев начинали погибать на 8—10-е сутки. Условные обозначения: НО — не определяли; ЛД₅₀ — доза вируса, вызывающая гибель 50 % животных в каждой группе на 14-е сутки после заражения. Величина ЛД₅₀ подсчитана по методу Рида и Менга. Данные взяты из работы [292] с разрешения авторов.

294]. Кроме того, эти варианты отличаются от исходного реовируса типа 3 и по характеру патологических изменений, вызываемых ими у мышат-сосунков после внутримозгового введения. Они поражают лишь небольшую часть из тех типов клеток, которые способен заражать вирус дикого типа (рис. 20.7) [293]. Эти факты вновь указывают на ключевую роль белка $\sigma 1$ в распространении вирусной инфекции.

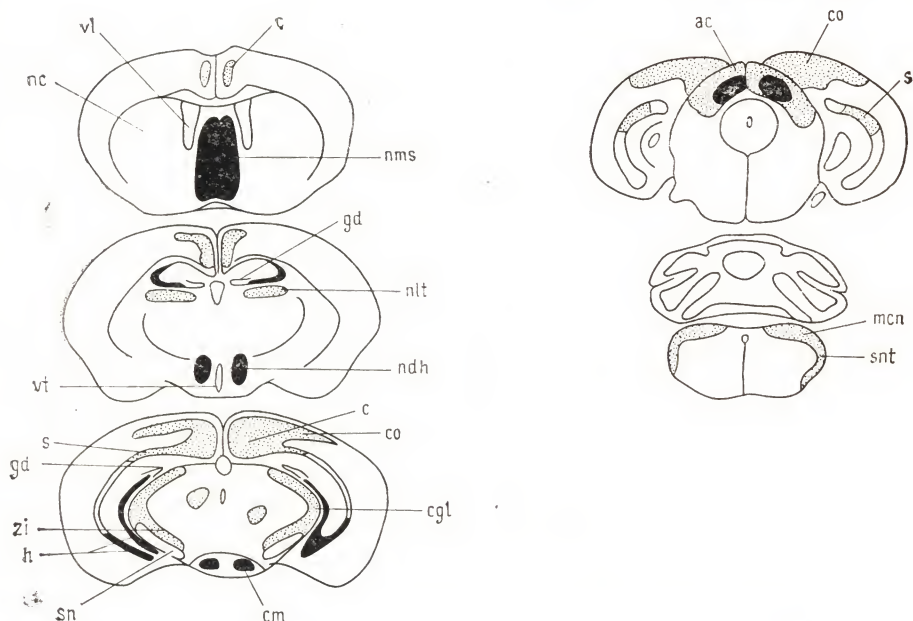


Рис. 20.7. Диаграммы венечных разрезов от передней (левый верхний) к задней (правый нижний) области мозга мышей, зараженных внутричерепно реовирусом типа 3 (штамм Dearing или вариант этого штамма). Черным цветом показаны области, поражаемые обоими вирусами, а точками — области, поражаемые только вирусом штамма Dearing. (Из работы [293] с разрешения авторов.) ac — anterior colliculus; c — cingulum, nc — nucleus caudatus; gd — gyrus dentatus; ndh — nucleus dorsomedialis hypothalami; h — hippocampus; cgl — corpus geniculatum laterale; nlt — nucleus lateralis thalami; vl — ventriculus lateralis; cm — corpus mamillare; nms — nucleus medialis septi; co — cortex occipitalis; s — subiculum; sn — substantia nigra; snt — spinalis nervi trigemini; vt — ventriculus tertius; zi — zona incerta.

Иммунный ответ организма-хозяина

В задачу этого раздела не входит рассмотрение всех аспектов проблемы иммунного ответа на реовирусную инфекцию. Эту информацию можно найти в более специальных обзорах (см., например, [256]).

Гуморальный иммунный ответ

В ответ на реовирусную инфекцию появляются нейтрализующие типоспецифические антитела и антитела, подавляющие реакцию гемагглютинации. Нейтрализующие антитела направлены преимущественно против белка наружного капсида $\sigma 1$ [334]. Нейтрализующей способностью обладают также некоторые мо-

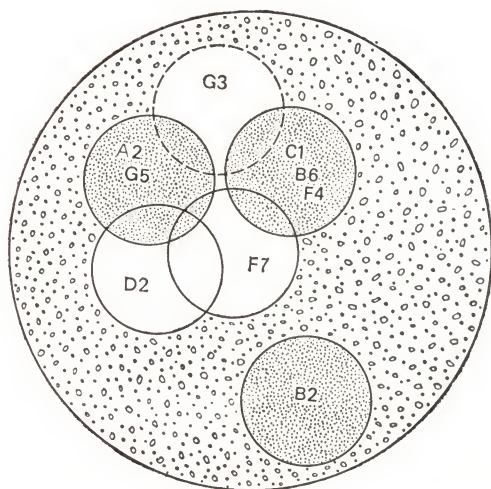


Рис. 20.8. Взаимное расположение антигенных доменов в молекуле гемагглютини́на реовируса типа 3 (из работы [294] с разрешения авторов). Моноклональные антитела, связывающиеся с определенными доменами, отмечены кружками, заполненными точками, а антитела, связывающиеся с эпитопами, которые перекрывают эти домены, — светлыми кружками. Пунктирная линия вокруг антитела G3 означает, что данные радиоиммунологического анализа не позволяют точно определить его локализацию.

ноклональные антитела против белка шипов ($\lambda 2$) и белка наружного капсида $\sigma 3$ [118, 133]. Они способны нейтрализовать реовирусы всех трех серотипов и, следовательно, не относятся к типоспецифическим. Реакция нейтрализации с использованием типоспецифических антител ясно показала, что серотипоспецифическая нейтрализация определяется только природой сегмента S1 геномной РНК. Реассортанты реовирусов, несущие сегмент S1 определенного типа, нейтрализуются антителами, специфичными в отношении именно этого серотипа, независимо от происхождения остальных девяти сегментов. И наоборот, типоспецифические антитела не нейтрализуют вирус, сегмент S1 которого происходит из вируса другого серотипа [335].

Белок $\sigma 1$ играет главную роль и в реакции подавления гемагглютинации. Следует напомнить, что гемагглютинация типоспецифична и определяется природой сегмента S1 и соответственно белка $\sigma 1$. Поэтому не удивительно, что $\sigma 1$ служит типоспецифическим антигеном для антител, подавляющих гемагглютинацию [338]. Есть сообщения о том, что белок наружного капсида $\sigma 3$ также может служить антигеном для антител, подавляющих гемагглютинацию [118, 133]. Эти данные трудно связать

с результатами генетических исследований, согласно которым только продукт гена S1 ответствен за индукцию антител, подавляющих гемагглютинацию.

Получен набор моноклональных антител против белка $\sigma 1$ реовируса типа 3 [48, 118, 159]. Некоторые из них обладали нейтрализующей способностью, но не подавляли гемагглютинацию. Другие, напротив, тормозили гемагглютинацию, но не нейтрализовали вирус [48]. В этих исследованиях убедительно показано, что $\sigma 1$ имеет три разных функциональных эпитопа. Используя конкурентный радиоиммунный анализ, установили, что эти эпитопы связаны с разными структурными областями белка $\sigma 1$ [294] (рис. 20.8). «Нейтрализующий» эпитоп узнается моноклональными антителами A2 и G5; «гемагглютинирующий» — антителами C1, B6 и F4. Третий эпитоп, функционально отличающийся от этих двух, узнается антителом B2.

Клеточный иммунитет

Данные о взаимодействии реовирусов с лимфоцитами суммированы в табл. 20.13.

Таблица 20.13. Результаты взаимодействия реовирусов с лимфоцитами ¹

Результат взаимодействия	Источник данных
Образование цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ)	[79, 80, 165]
Индукция зависимой от Т-клеток гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)	[110, 246, 336]
Появление супрессорных Т-клеток и индукция толерантности	[110]

¹ Из работы [256] с разрешения авторов.

У взрослых мышей, которым внутрибрюшинно был введен реовирус, появляются цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), специфичные по отношению к серотипу вируса [81]. Реовирус-специфические ЦТЛ распознают преимущественно конкретный антигенный домен белка $\sigma 1$, который участвует в определении нейротропности вируса и связывает вируснейтрализующие антитела [81]. Эти ЦТЛ появляются через 3—5 сут после заражения и сохраняются до двух месяцев. Анализ реассортантов показал, что типоспецифичность ЦТЛ определяется преимущественно (но не исключительно) природой белка $\sigma 1$ [81]. Взаимодействие ЦТЛ с зараженными клетками может блокироваться в присутствии типоспецифической антисыворотки. Сыворотка против реовируса типа 3 блокирует взаимодействие зараженных

клеток лишь с ЦТЛ, специфичных в отношении вируса типа 3, а сыворотка против вируса типа 1 — лишь ЦТЛ соответствующей специфичности. Блокирующая способность антисыворотки определяется природой сегмента S1 дцРНК реассортанта и не зависит от источника других сегментов [79].

Роль ЦТЛ в природной инфекции неясна. Облучение мышей УФ-светом приводит к истощению у них популяции (*Ia*)-несущих антиген-презентирующих клеток (АПК), которые необходимы для образования вторичных ЦТЛ [165]. Такие мыши не отличаются явно от своих необлученных собратьев по способности переносить реовирусную инфекцию после внутрибрюшинного или перорального введения вируса [165]. Мыши линии *nude*, лишенные Т-лимфоцитов, также переносят реовирусную инфекцию по крайней мере не хуже обычных мышей [165].

Если животным, иммунизированным путем подкожного введения реовируса, через 5—7 сут вновь ввести подкожно реовирус того же серотипа, у них индуцируется серотипспецифическая гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). ГЗТ возникает лишь в том случае, когда серотип вводимого вируса идентичен серотипу вируса, использованного для иммунизации. Генетический анализ реассортантных реовирусов показал, что для проявления ГЗТ необходима идентичность сегментов S1 вирусов, использованных для иммунизации и для индукции ГЗТ [110, 336].

Иногда индукции ГЗТ не происходит, и животные оказываются «толерантны» к реовирусу (табл. 20.14). Толерантность

Таблица 20.14. Влияние способа введения вируса на индукцию ГЗТ¹

Способ заражения	Реовирус типа 1		Реовирус типа 3	
	интакт- ный	УФ-облученный	интакт- ный	УФ-облученный
Внутрибрюшинно	ГЗТ	ГЗТ	ГЗТ	ГЗТ
Внутривенно	»	Толерантность	»	Толерантность
Подкожно	»	ГЗТ	»	ГЗТ
Перорально	—	Толерантность	—	»

¹ Из работы [256] с разрешения авторов.

связана с появлением серотипспецифических Т-супрессоров [110]. Как возникновение ГЗТ, так и индукция толерантности специфичны в отношении серотипа реовируса: для индукции толерантности необходимо, чтобы серотип вводимого вируса был идентичен серотипу вируса, использованного при иммунизации. Мыши, толерантные по отношению к реовирусу типа 3, нетоле-

рантны к реовирусу типа 1. Генетический анализ вновь показал, что антигеном, ответственным за супрессию ГЗТ (т. е. за толерантность), является $\sigma 1$ [246].

Можно проводить пассивный перенос толерантности животным-реципиентам, используя Т-лимфоциты селезенки или брыжеечных лимфоузлов толерантного донора [256]. Любопытно, что инактивированный УФ-светом вирус вызывает толерантность только после внутривенного (реовирусы типов 1 и 3) или перорального (лишь реовирус типа 1) введения. Если такой вирус вводится внутрибрюшинно или подкожно, толерантность не развивается, а возникает ГЗТ (табл. 20.14). Способность реовируса вызывать толерантность при пероральном введении связана с природой сегмента М2: реассортанты, несущие М2-сегмент вируса типа 1, способны к индукции толерантности после перорального введения, а несущие М2 типа 3 — нет [246]. Как известно, М2 кодирует белок наружного капсида $\mu 1/\mu 1C$. Этот белок определяет относительную стабильность или чувствительность реовируса к протеазам *in vitro*. Реовирусы, содержащие М2 типа 1, устойчивы к протезной обработке *in vitro* и, возможно, к пищеварительным протеазам *in vivo*. Такие вирусы, инактивированные УФ-светом, также способны вызывать толерантность после перорального введения [246].

Образование интерферона

Реовирусы могут индуцировать образование интерферона [119, 155, 173, 206, 210]. Как показало изучение температурочувствительных мутантов, количество интерферона определяется выходом вирусного потомства и не зависит от количества вирусной РНК (как одно-, так и двухцепочечной) или белков [155]. При перmissive температуре (31°C) *ts*-мутанты реовируса индуцируют образование такого же количества интерферона, как и вирус дикого типа, а при неpermissive (39°C) — значительно меньшие количества [155]. «Верхний компонент» («пустые» частицы) и сердцевина вирионов не вызывают синтез интерферона [155]. Инактивированные УФ-светом реовирусы обладают такой способностью, хотя механизм индукции в этом случае, по-видимому, иной, чем при продуктивной инфекции [256]. Количество интерферона, образующегося при заражении вирусом дикого типа, инактивированным УФ-светом, меньше, чем при заражении интактным вирусом. Любопытно, что один из *ts*-мутантов реовируса (*tsC*) вызывает синтез большего количества интерферона после УФ-облучения. *tsC* не способен синтезировать дцРНК и не индуцирует синтез интерферона при неpermissive температуре (39°C). Однако после УФ-облучения сердцевина вируса теряет «герметичность» и

часть дцРНК выходит в клетке наружу [119]. Предполагается, что именно эта РНК и стимулирует образование интерферона.

Эффективность индукции синтеза интерферона определяется серотипом вируса и видом зараженных клеток; например, реовирус типа 3 более эффективен как индуктор интерферона в случае клеток L, чем реовирус типа 1 [256].

Влияние интерферона на репликацию реовируса изучалось в работах [58, 111, 205, 207]. Интерферон подавляет трансляцию ранних мРНК [192]. Предполагают, что это ведет к подавлению синтеза вирусной транскриптазы [256, 340]. Интерферон индуцирует синтез протеинкиназы [111], которая фосфорилирует фактор инициации 2 (IF-2), подавляя тем самым белковый синтез. Возможно, в этом и состоит механизм индуцированного интерфероном подавления синтеза реовирусных белков в зараженных клетках [205]. В обработанных интерфероном клетках HeLa появляется также эндорибонуклеаза (РНКаза), расщепляющая реовирусные мРНК [206].

Повреждения клеток

О механизмах повреждения клетки, зараженной реовирусом, в том числе об изменении клеточного метаболизма и организации цитоскелета, мы уже говорили в этой главе.

Персистентная инфекция

Являясь в большинстве случаев литическими вирусами, реовирусы тем не менее способны вызывать персистентную инфекцию во многих клеточных культурах, включая фибробласты эмбриона человека [25], клетки яичника китайского хомячка [309] и мышинные L-клетки [5—10]. Установлению персистентной инфекции способствует использование вируса, пассируемого при высокой множественности заражения. Такие препараты содержат большое число делеционных и *ts*-мутантов [7, 209, 251, 9, 10]. Весьма распространены *ts*-мутанты с повреждениями в РНК-сегменте S4 [9, 10]. У делеционных мутантов часто оказываются утрачены сегменты L1 и L3 [9, 10]. Встречаются делеционные мутанты с повреждениями и в других сегментах, например в S4 [9, 10].

В популяциях вирусов, применяемых для установления персистентной инфекции клеточных культур, очень часто встречаются мутанты по сегменту S4; это свидетельствует о важной роли сегмента S4 в данном процессе. Совместное заражение клеток L реовирусом типа 2 и делеционными мутантами реовируса типа 3 (предположительно, несущими мутации в сегменте S4) приводит к появлению персистентно инфицированных кле-

ток, которые всегда содержат сегмент S4 из делеционного мутанта типа 3 [6]. Эти результаты еще раз свидетельствуют о ключевой роли S4 в установлении персистентной инфекции. Данный сегмент кодирует белок наружного капсида $\sigma 3$, который участвует в подавлении синтеза белков и РНК клетки-хозяина [256]. Предполагают, что мутация в сегменте S4 приводит к появлению такого белка $\sigma 3$, который слабо подавляет процессы клеточного синтеза, позволяя клетке выживать при персистентной инфекции [256].

При длительной персистентной инфекции мутации появляются и в других сегментах дцРНК. Они часто возникают в сегменте S1, возможно, изменяя способность белка $\sigma 1$ подавлять синтез клеточной ДНК [256]. Описано множество других мутаций в потомстве *ts*-мутантных реовирусов, использованных для получения персистентно зараженной культуры. Эти мутации часто не имеют отношения к поддержанию персистентной инфекции; они свидетельствуют лишь о высокой частоте генетических изменений, происходящих в популяции реовирусов в ходе инфекции [10, 11].

Для установления персистентной инфекции необходимо, чтобы цитопатический эффект вируса был ослаблен. Такое ослабление может произойти в результате мутаций в сегменте S4, ведущих к утрате способности реовируса подавлять синтез РНК и белков клетки-хозяина [256]. Поддержанию персистентной инфекции способствуют и мутации в сегменте S1, предотвращающие индуцированное вирусом подавление синтеза клеточной ДНК [256].

Подойти к выяснению механизма возникновения мутаций в сегментах S4 и S1 позволили генетические исследования [46]. Главная роль в индукции мутаций принадлежит сегменту L2. В мутагенезе участвует также ген M3, который определяет, в каком сегменте произойдет делеция. Продукты генов L2 и M3 (соответственно белки $\lambda 2$ и μNS), предположительно, являются компонентами вирусного транскриптазного комплекса [197].

Итак, ген L2 с участием гена M3 может играть роль в возникновении мутаций в сегментах S4 и S1, что в свою очередь может приводить к развитию и поддержанию персистентной инфекции (рис. 20.9).

Развитие персистентной инфекции связано не только с изменениями вируса. При персистентной инфекции клеток L наблюдаются мутации как в вирусной частице, так и в клетке. Описаны мутантные клетки L (линия LR), в которых реовирус дикого типа не способен вызывать литическую инфекцию [8, 140]. Для них характерна измененная ультраструктура [256].

Клональный изолят вируса (L/C), выделенный из персистентно инфицированных клеток L, приводит к литической инфекции

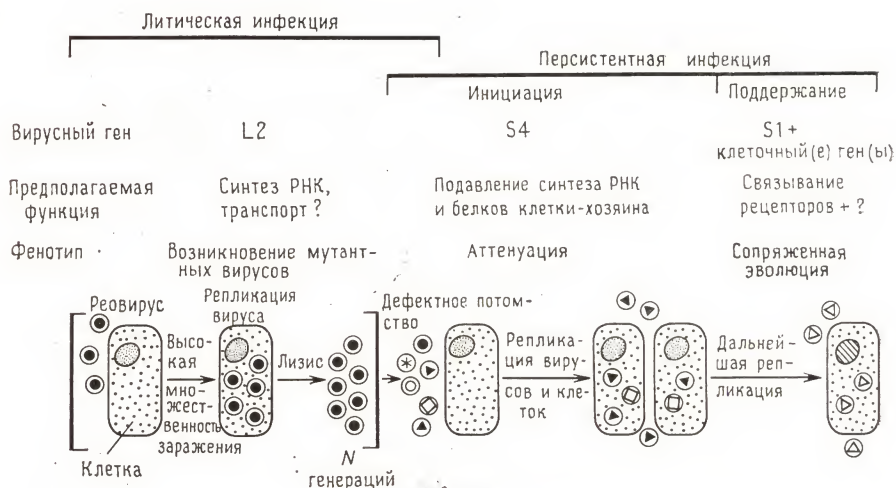


Рис. 20.9. Схема развития персистентной инфекции. Вирионы дикого типа обозначены окаймленными черными кружками, а мутантные вирионы — другими символами. Ядра клеток L дикого типа заполнены точками, а ядра мутантных клеток заштрихованы. (Из работы [46] с разрешения авторов.)

клеток LR-7 с более высоким выходом вируса, чем в случае клеток L. Реассортанты, содержащие сегмент S1 вируса L/C, но не вируса дикого типа, способны реплицироваться в клетках LR-7 [140]. Это еще раз подтверждает представление о том, что мутации в сегменте S1 наряду с мутациями в сегменте S4 ответственны за поддержание персистентной инфекции.

Показано, что обработка клеток L хлоридом аммония приводит к подавлению литической реовирусной инфекции и к развитию персистентной инфекции [49]. Хлорид аммония — лизосомотропный агент, который приводит к повышению pH и тем самым, возможно, препятствует раздеванию вирионов. Однако до конца его роль в развитии персистентной инфекции не установлена.

Реовирусы и заболевания человека и животных

Заболевания человека

Значение реовирусов как патогенных агентов человека остается неясным. Эпидемиологические данные о распространенности антител к реовирусам показывают, что эти вирусы повсюду и иммунитет к ним развивается у большинства людей [127,

299]. Антитела к реовирусам обнаруживаются у менее чем 25% детей до 5 лет, но к 20—30 годам они присутствуют уже у более чем 50% населения [127, 299]. Это указывает на возможность контакта с реовирусами в младенчестве или раннем детстве.

Хотя в подавляющем большинстве случаев реовирусная инфекция протекает бессимптомно [127, 161, 295, 299], есть две категории заболеваний, которые могут быть связаны с реовирусами: инфекции верхних дыхательных путей (часто сопровождаемые лихорадкой, фарингитом, кашлем и изредка сыпью) и энтериты (обычно протекающие со спазмами кишечника и диареей).

Недавно получены данные о возможной роли реовирусов в возникновении желчной атрезии [23, 193]. Было обнаружено, что у двух из 12 обследованных детей с желчной атрезией наблюдается повышенный титр нейтрализующих антител к реовирусу типа 3 [23]. У одного из детей отмечено четырехкратное увеличение титра (до 1:240), а у второго трехкратное (до 1:120). В обоих случаях титр антител у матерей не превышал 1:20, что исключает возможность трансплацентарного распространения нейтрализующих антител. В другом исследовании для обнаружения антител применили метод непрямой иммунофлуоресценции. Оказалось, что у 68% детей с желчной атрезией присутствуют антитела к вирусу типа 3 с титром 1:10; в контрольной группе доля таких детей составляет 8%. Примерно у $\frac{1}{3}$ детей наблюдалось четырехкратное увеличение титра, причем величина его была существенно выше, чем у матерей [193].

Для выяснения вопроса о роли реовирусов как патогенных агентов человека группы взрослых добровольцев заражали реовирусами типов 1, 2 и 3. У $\frac{1}{3}$ людей, зараженных вирусами типов 1 и 2, развились заболевания, сопровождаемые головной болью, насморком, общим недомоганием, фарингитом и кашлем. Примерно у $\frac{1}{4}$ зараженных реовирусом типа 3 развился легкий ринит. Инкубационный период этих заболеваний составил 1—3 сут, продолжительность от 4 до 7 сут [242].

Реовирусы были выделены и при других заболеваниях человека, причем в большинстве случаев явной связи между вирусом и заболеванием не установлено (табл. 20.15).

Заболевания животных

Как мы уже отмечали, реовирусы — вездесущие агенты; они могут заражать фактически любого представителя животного мира. Сведения о заражении реовирусами в природных условиях ограничены [73, 127, 174, 253, 275, 298, 299, 317, 344]. Гораздо более полная информация получена при экспериментальном

Таблица 20.15. Реовирусы и их связь с заболеваниями человека

<i>Вероятная связь</i>	
Энтериты у младенцев и детей (редко)	[96, 243]
Инфекции верхних дыхательных путей (редко)	[127, 242, 299]
<i>Возможная связь</i>	
Желчная атрезия	[23, 193]
<i>Отдельные случаи</i> (требуют подтверждения и/или до- полнительного изучения)	
Заболевания нервной системы	
Менингит, энцефалит, энцефаломиелит	[136, 151]
Хронические психические заболевания, слабоумие	[18]
Гепатит	[136]
Пневмония	[313]
Лимфома Бёркита	[26, 168, 181]
Заболевания почек (вирурия)	[67]

заражении лабораторных животных (крыс, мышей, хомячков и африканских хорьков) [144, 177, 178, 305, 326, 327].

Наиболее подробно изучены последствия заражения реовирусами мышат-сосунков. Заражение мышат можно осуществлять разными путями — с помощью внутримозговой инъекции, перорально, подкожно, внутримышечно и внутрибрюшинно. В некоторых исследованиях применяли также интраназальное [127], интраспинальное и интраокулярное введение (K. L. Tyler, неопубликованные данные). Патологические изменения, возникающие в разных органах мышат-сосунков после заражения реовирусами, кратко описаны в последующих разделах.

Патологические изменения в различных органах и системах

Центральная нервная система

Реовирус типа 3. Через 2—14 сут после введения реовируса типа 3 у мышат-сосунков развивается энцефалит с летальным исходом [178, 226, 293, 318, 326, 335, 337]. В течение первых 27—72 ч после заражения животные чувствуют себя хорошо, а затем становятся менее активными [178, 226, 326]. В последующие несколько дней походка животных, уже научившихся ходить, становится неуверенной. По мере развития болезни животное теряет способность вставать, сохранять равновесие. Затем, быстро сменяя друг друга, наступают высокочастотный тремор, очаговые судороги и паралич. Смерть обычно наступает в период между 8-ми и 15-ми сутками [178, 226, 326]. Наиболее летален вирус типа 3 (штамм Dearing) при внутрицеребральном введении; ЛД₅₀ составляет 10 БОЕ.

Патологические изменения, возникающие при энцефалите, вызванном реовирусом типа 3, изучены достаточно хорошо [178, 226, 293, 318, 326, 335, 337]. Наблюдается обширный некроз коры головного мозга с кровоизлияниями или без них. Обнаруживаются серьезные повреждения нейронов лимбической системы, включая гиппокамп, септальные ядра и мамиллярные тела. Значительные повреждения наблюдаются и в ганглиозных клетках сетчатки [315]. Некроз обычно захватывает участки таламуса, базальных ганглиев и верхнего мозгового ствола. В различной степени бывает поражен мозжечок, при этом особенно серьезные повреждения обнаруживаются в клетках Пуркинье. Индуцированные вирусом патологические изменения в спинном мозге, корешках спинномозговых ганглиев и периферической нервной системе изучены недостаточно.

Многие нейроны содержат единичные или множественные цитоплазматические включения (см. выше). Такие включения лишь изредка находят в глиальных клетках. Сосуды мозговых оболочек оказываются окруженными слоями одноядерных клеток. У животных, переживших острый период заболевания, развиваются изменения в глиальных элементах. Воспалительная реакция мозговой паренхимы, как правило, не слишком выражена. Изменения не затрагивают белого вещества мозга.

Природные изоляты реовирусов серотипа 3 различаются как по вирулентности, так и по наивысшему титру, достигаемому в ходе мозговой инфекции, но одинаковы по топографии и характеру вызываемого заболевания [122]. Антигенные варианты этих вирусов, полученные в результате отбора с применением антител против белка $\sigma 1$ (гемагглютинин), значительно менее вирулентны. Они отличаются от вирусов дикого типа и по характеру индуцируемых ими патологических изменений: повреждения захватывают лишь часть областей, поражаемых вирусами дикого типа. В основном повреждается гиппокамп; в меньшей степени поражаются лимбические области, включая септум и мамиллярные тела, а кора практически не затрагивается [293] (рис. 20.7).

Нервная патология, вызываемая *ts*-мутантами вируса типа 3, изучена слабо. Одни мутанты вызывают такие же заболевания, как и вирус дикого типа, другие приводят к развитию легких форм заболеваний с незначительным поражением нервной ткани и слабой воспалительной реакцией [227]. Поскольку нормальная температура тела крыс и мышей лежит в интервале между перmissiveй (31 °C) и неперmissiveй (39 °C) температурами для *ts*-мутантов вирусов, *in vivo* мутации, возможно, проявляются не в полной мере.

Реовирус типа 1. Реовирус типа 1 вызывает канальный стеноз с последующей гидроцефалией [128, 144, 177, 182, 204, 221,

327, 335, 337]. Ни нейроны и глиальные клетки, ни белое вещество мозга практически не повреждаются. Вирус заражает клетки передней доли гипофиза [212]. Применение электронной микроскопии и метода иммунофлуоресценции позволяет выявлять вирус в клетках передней доли, продуцирующих гормон роста. У животных часто обнаруживаются аутоиммунные антитела против гормона роста и снижается концентрация этого гормона в сыворотке крови [212].

Реовирус типа 2. У мышат-сосунков, зараженных реовирусом типа 2, может развиваться энцефалит [327]. Соответствующие данные весьма неполны, однако ясно, что повреждения достигают максимального уровня примерно к десятому дню инфекции и в основном затрагивают кору головного мозга и ядра таламуса. Изменения обнаруживаются также в мозжечке и связанных с ним полосках белого вещества [327]. Имеющиеся данные не позволяют провести полноценное сравнение энцефалитов, вызываемых реовирусами типов 2 и 3.

Генетика нейротропности реовирусов. Реовирусы типов 1 и 3 вызывают вполне определенные, четко различающиеся поражения ЦНС (см. выше). Реовирус типа 3 заражает нейроны и вызывает энцефалит с летальным исходом. Вирус типа 1 нейроны не заражает, но вызывает эпендимит, гидроцефалию и инфицирует переднюю долю гипофиза. Типоспецифический характер инфекции определяется природой гена S1, кодирующего поверхностный полипептид $\sigma 1$ (см. раздел «Патогенез»).

Сердце

Все серотипы реовирусов вызывают повреждения миокарда у мышат-сосунков [115, 326, 327]. Наиболее выраженные патологические изменения наблюдаются между 9-ми и 13-ми сутками, а затем может наступить выздоровление. Невооруженным глазом видны небольшие беловатые пятна на поверхности эпикарда. Под микроскопом клетки миокарда выглядят разбухшими и фрагментированными. Они теряют свою поперечную исчерченность, их ядра фрагментируются. В острый период могут образовываться коагуляционные некрозы, распространяющиеся на всю толщину сердечной стенки. Эти некрозы заполнены остатками ядер и цитоплазмы погибших клеток и могут позже кальцинироваться. В цитоплазме выживших мышечных клеток появляются эозинофильные включения; о наличии в них вируса свидетельствуют электронно-микроскопические и иммунофлуоресцентные данные. Воспалительный инфильтрат обычно не выражен, но если образуется, то состоит из отдельных лимфоцитов и макрофагов [326].

Легочные заболевания

После заражения мышат-сосунков любым из трех типов реовирусов у них в легких появляются разбросанные очаги альвеолярных кровоизлияний. Часто это сопровождается эдемой легких. Вслед за пролиферацией альвеолярных клеток наступает некроз и гиалинизация. Заполнение легочной соединительной ткани лимфоцитами, макрофагами и мононуклеарными клетками может вести к образованию плотных агрегатов, напоминающих гранулемы.

Печень, селезенка, поджелудочная железа, система желчных путей

Реовирусы всех трех серотипов после введения мышатам-сосункам вызывают патологические изменения в печени [23, 216—218, 222, 300, 305, 326, 327]. Это выражается в появлении небольших (1—3 мм) пораженных участков желтого цвета на поверхности печени. Вначале некроз развивается в межзональной области и области центральных долей печени, а затем распространяется дальше, образуя более обширные зоны коагуляционного некроза и кровоизлияний. На пике заболевания целые доли печени превращаются в аморфную некротизированную массу без признаков клеточного строения («чертовы доли»). Наблюдаются разнообразные изменения гепатоцитов, включая эозинофильную дегенерацию, разбухание, атрофию и явный некроз. Появляются внеклеточные эозинофильные (ацидофильные) гиалиновые тельца, напоминающие тельца Каунсилмэна. Воспалительная реакция выражается в субкапсулярном накоплении агрегатов мононуклеарных клеток и в воспалении вокруг центральной вены и портальной триады. Обычно наблюдается гиперплазия клеток Купфера, а синусоиды заполняются эритроцитами и клеточными обломками.

Реовирусы всех трех типов способны повреждать поджелудочную железу у мышат-сосунков. Наблюдается прогрессивное повреждение ацинарных клеток экзокринной части поджелудочной железы: они становятся базофильными и утрачивают характерные для них гранулы зимогена. Вслед за этим наблюдается растворение ядер и полный лизис клеток. Каналы и каналы железы оказываются забитыми обломками погибших клеток. Очаг воспаления, состоящий из лимфоцитов, макрофагов и полиморфнуклеарных клеток, формируется примерно к 7-м суткам. Развивается острый панкреатит, который может перейти в полный базофильный некроз поджелудочной железы с последующим замещением жировой тканью [43, 211, 212, 326, 327].

Практически такая же патология характерна для слюнных желез.

Реовирусы типов 1 и 3 способны инфицировать и повреждать эндокринную часть поджелудочной железы. Островки Лангерганса превращаются в очаги коагулирующих некрозов и инфильтруются моноклеарными клетками. По данным электронной микроскопии и иммунофлуоресценции реовирусы типа 3 заражают инсулинпродуцирующие бета-клетки, не затрагивая остальные клеточные компоненты островков [211]. Реовирус типа 1 также вызывает образование очаговых некрозов островков поджелудочной железы. У многих животных появляются аутоиммунные антитела против инсулина и других цитоплазматических антигенов клеток островков. Уровень инсулина в крови падает, у многих мышей развивается аномальная толерантность к глюкозе.

Генетические исследования, проведенные с помощью реассортантов, показали, что возникновение аутоиммунного ответа на инсулин обусловлено исключительно природой гена S1 (он кодирует белок $\sigma 1$): противоинсулиновые антитела появляются лишь в том случае, если ген S1 происходит из вируса типа 1 [212].

Заражение вирусом типа 3 (штамм Dearing) приводит к инфекции клеток слизистых желчных протоков, влекущей за собой развитие хронической обструктивной желтухи [23, 216—218, 222, 301, 305, 326, 327]. Именно сходство поздних гистологических стадий этого поражения с желчной атрезией человека стимулировало исследования противореовирусных антител у детей с этим заболеванием (см. выше).

Синдром маслянистой шерсти и карликовости. Вскоре после проведения первых опытов по заражению мышат-сосунков реовирусами был описан синдром маслянистой шерсти (ОНЕ, от англ. *oily hair effect*) [299, 302, 304, 305]. При классическом проявлении синдрома мыши выглядят так, будто их искупали в масле [318]. Большинство таких животных отстают в росте (синдром карликовости) [305, 326]. У многих из них наблюдается так называемый ахолический стул: испражнения содержат жир [318, 326]. Частоту проявления ОНЕ определить трудно. Он возникает менее чем у 10 % животных, переживших три недели после заражения реовирусом типа 3 [326]. Предполагается, что синдром связан с резким нарушением всасывания, которое обусловлено одновременным поражением поджелудочной железы, печени и желчной системы [302, 305, 326]. У таких животных всегда развивается желтуха.

У мышей, зараженных реовирусом типа 1, также развивается синдром маслянистой шерсти, частота проявления которого, по данным некоторых авторов, достигала 50 % [212]. У $3/4$ животных с задержкой роста появляются все признаки

этого синдрома, включая маслянистую шерсть и стеаторею. Карликовость животных, зараженных вирусом типа 1, вероятно, обусловлена инфекцией клеток передней доли гипофиза, продуцирующих гормон роста. У таких животных заметно снижен уровень циркулирующего гормона, появляются аутоиммунные антитела к нему [212]. Маслянистая шерсть и стеаторея связаны с поражением экзокринной части поджелудочной железы. Желтуха же, как правило, не развивается, что объясняется слабым поражением желчной системы.

Мышцы. Вирус типа 3 вызывает некротический миозит в поперечнополосатых мышцах. Эти изменения обычно начинаются на 7-е сутки после заражения. Мышечные клетки вздуваются и теряют поперечную исчерченность. Затем происходит их фрагментация, сопровождаемая выраженным базофильным окрашиванием и появлением очагов кальцинации. К концу второй недели инфекции мышцы оказываются сильно некротизированными. Воспалительный инфильтрат состоит в основном из лимфоцитов и макрофагов и появляется в течение второй недели. Вирус типа 1 вызывает очаги интерстициального и периваскулярного воспаления в мышцах [316, 327], однако некротический миозит не наблюдается.

Генетические исследования показали, что различия в степени поражения мышц, вызываемого вирусами типов 1 и 3, обусловлены различиями в гене S1 (см. разд. «Патогенез»), который кодирует поверхностный полипептид $\sigma 1$.

Другие заболевания. Описаны случаи заражения реовирусом эмбрионов млекопитающих [1, 225]. Сообщалось об индуцированных реовирусом перитоните [219] и лимфоме [223] у мышей. Описан также синдром персистентной реовирусной инфекции [137] и ограниченного энцефалита у взрослых мышей [311].

Закключение. У зараженных реовирусом животных наблюдаются разнообразные патологии, и это создает хорошие экспериментальные модели, позволяющие изучать различные заболевания человека, например энцефалит, болезни эндокринной системы, желчную атрезию и миозит. Реовирусные повреждения ряда органов (нервная система, скелетные мышцы, печень, система желчных путей) типоспецифичны (т. е. их характер определяется серотипом вируса). Главным фактором, определяющим типоспецифичность поражения ЦНС и мышц, является ген S1, кодирующий поверхностный полипептид $\sigma 1$. Типоспецифические различия в характере поражения других органов (включая сердце, легкие и железы внутренней секреции) не выявлены.

Диагностика реовирусной инфекции

Дифференциальная диагностика

Роль реовирусов следует учитывать при дифференциальной диагностике вирусных инфекций верхних дыхательных путей и вирусиндуцированных кишечных расстройств, особенно у детей [303]. Никакие специфические диагностические особенности синдромов, индуцированных реовирусами, не выявлены (см. выше). Остается проблематичной и связь между первичной желчной атрезией новорожденных и реовирусной инфекцией. Чтобы доказать причастность реовирусной инфекции к этому заболеванию, нужны дополнительные исследования. Реовирусы могут рассматриваться как возможные возбудители заболеваний ЦНС с неустановленной этиологией, включая энцефалиты и менингиты. Следует подчеркнуть, однако, что до сих пор сообщения о реовирусиндуцированных заболеваниях ЦНС относительно редки и в значительной степени малодостоверны.

Лабораторная диагностика

Как мы уже отмечали, реовирусную инфекцию связывают с заболеваниями дыхательных путей и пищеварительного тракта. Вирус можно выделить из мазков, взятых из полости носа и рта, или из фекалий. В редких случаях его удавалось выделить из крови, мочи или спинномозговой жидкости. Для выделения вируса проводят культивирование кусочков тканей, полученных при биопсии или некропсии. Техника выделения реовируса из мазков суммирована в обзоре [241]. Образцы фекалий из ануса получают с помощью сухого ватного тампона. Поверхность тампона с видимыми следами фекалий взбалтывают в пробирке с раствором Хэнкса, содержащим пенициллин (500 ед./мл) и стрептомицин (500 мкг/мл). Аналогичные процедуры применяют и в случае мазков, взятых из полости рта и носа. Образцы следует хранить при -70°C , хотя допустимо и кратковременное хранение в морозильной камере обычного холодильника. Образцы фекалий нужно предварительно отцентрифугировать (3000 об/мин, 4°C , 30 мин) и лишь затем использовать для внесения в культуру ткани [241].

Реовирусы способны реплицироваться и вызывать цитопатический эффект во многих клеточных культурах. При выделении вируса обычно используют клетки почек макаков или мышинные фибробласты L. В сыворотке, применяемой для культивирова-

ния, не должны присутствовать вируснейтрализующие антитела. Если такой сыворотки нет, то клетки перед инкубацией следует промыть несколько раз раствором Хэнкса. Клетки почек макаков можно поддерживать на среде 199 или на среде МЕМ, модифицированной Йокликом. В среду следует добавлять глутамин до концентрации 1 %, а также пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Мы добавляем сыворотку (5 %), свободную от реовируснейтрализующих антител, к обоим применяемым средам. Можно также использовать бессывороточную среду [241].

Вирусный препарат наносят на сплошной монослой клеток и инкубируют при 37°C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Монослой проверяют на наличие цитопатического эффекта каждые 48 ч в течение 3 нед. Если эффект не обнаруживается, проводят второй «слепой» пассаж культуральной жидкости и наблюдают за клетками еще в течение недели [243]. В качестве контроля используют не инкубированные с вирусными инокулятами монослойные культуры клеток, чтобы ограничить естественное старение культуры от цитопатического эффекта. Для зараженных клеток характерна выраженная зернистость цитоплазмы. Цитоплазматические включения выявляют с помощью специального окрашивания (см. разд. «Репликация»).

Реовирусы можно отличить от энтеровирусов по характерным особенностям вызываемого ими цитопатического эффекта (зернистая цитоплазма) и физико-химическим свойствам. Как мы отмечали, реовирусные частицы устойчивы к обработке эфиром, а их диаметр составляет 75 нм. Они способны реплицироваться в разнообразных клеточных культурах и в организме разных животных, включая мышат-сосунков. В зараженных клетках они вызывают образование цитоплазматических включений, которые легко выявляются после специального окрашивания.

Традиционный метод, применяемый для идентификации серотипа реовируса, основан на реакции торможения гемагглютинации. Он детально описан в ряде работ [47, 68, 241, 338].

Реовирусную инфекцию можно диагностировать не только в результате выделения вируса, но и с помощью серологических реакций [241]. При этом обычно предпочитают использовать реакцию торможения гемагглютинации, а не реакцию нейтрализации или связывания комплемента. Признаком острой реовирусной инфекции считают повышение титра подавляющих гемагглютинацию антител в четыре и более раза. Как мы говорили, при инфекции реовирусом типа 3 образуются обычно только гомотипические антитела, в то время как заражение реовирусами типов 1 и 2 часто вызывает как гомотипический, так и гетеротипический иммунный ответ.

Молекулярная эпидемиология

Как известно, все реовирусы млекопитающих можно разделить на три группы в соответствии с их серотипом [239]. С помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле исследовали полиморфизм сегментов геномной РНК реовирусов, принадлежащих к разным серотипам [121]. Как оказалось, для каждого из десяти РНК-сегментов реовирусов, принадлежащих одному серотипу, но выделенных от животных, обитающих в разных частях земного шара, характерен выраженный полиморфизм [121]. Более того, даже у разных изолятов реовирусов, полученных из одного и того же очага заболевания, длины сегментов РНК неодинаковы; это свидетельствует о том, что в одном очаге заболевания сосуществуют разные генетические варианты реовирусов [121].

Эти генетические различия проявляются при анализе последствий внутримозгового заражения мышат-сосунков различными изолятами реовирусов типа 3 [122]: ЛД₅₀ для разных изолятов различаются на три порядка (от 10¹ до 10⁴ БОЕ), а максимальный титр вируса в мозге — на два порядка [122]. При этом для всех изолятов выявлен нейротропизм, характерный для реовирусов типа 3.

Генетические основы различий вирулентности разных изолятов реовирусов типа 3 изучали, применяя реассортанты относительно невирулентных изолятов и вирулентных вирусов 1-го (штамм Lang) или 3-го (штамм Dearing) типов. Те реассортанты, которые содержали сегмент М2 реовируса типа 3 (Dearing), были высоковирулентны (ЛД₅₀ ≤ 50 БОЕ). Те же, у которых М2 происходил из относительно невирулентного реовируса (тип 3 Н/Та), сохраняли низкую вирулентность (ЛД₅₀ ≥ 10 000 БОЕ) [122]. Эти результаты в совокупности с описанными ранее [293, 294, 334а, 335] показывают, что если сегмент S1 определяет нейротропность вируса, то внутри данного серотипа (или, что то же самое, внутри группы с одним и тем же сегментом S1) относительный уровень вирулентности определяется сегментом М2 [122].

Генетика реовирусов

Генетика реовирусов исчерпывающе описана в соответствующих обзорах (см., например, [230]), поэтому мы ограничимся лишь кратким изложением этого вопроса. Кроме того, проблемы генетики вирусов животных подробно рассмотрены в гл. 7.

Типы мутантов

Условно-летальные температурочувствительные мутанты

ts-Мутанты реовирусов исходно были получены в результате химического мутагенеза с использованием азотистой кислоты (группы В, D и Е), нитрозогуанидина (группы С, F и G) или профлавина (группа А) [76b, 124a]. Эти мутанты нормально реплицируются при 31°C, но не при 39°C (непермиссивная температура), хотя *ts*-дефекты и не абсолютны. Используя химический мутагенез, удалось получить *ts*-мутанты, распадающиеся на семь групп из десяти возможных, определяемых по свойствам реассортантов [56, 76]. *ts*-Мутанты трех остальных групп были выделены из популяций вирусов дикого типа, серийно пассированных с высокой множественностью (*ts*-группа Н), и из «псевдоревертантов», полученных из персистентно зараженных клеток L (см. ниже) (*ts*-группы I и J) [9, 10, 230, 231]. Группы *ts*-мутаций удалось картировать, т. е. установить их соответствие определенным сегментам РНК (табл. 20.16). Для этого измеряли электрофоретическую подвижность сегментов геномной РНК реассортантов, полученных в результате «скрещивания» между *ts*-мутантами и вирусами дикого типа [57, 200, 200a, 230, 232a]. Биохимические и морфологические свойства мутантов групп А—G описаны в табл. 20.16.

Комплементация и интерференция

Высказывалось предположение, что при смешанном заражении клеток вирусами, принадлежащими к разным группам *ts*-мутантов, должна наблюдаться комплементация. Однако для некоторых групп комплементация отсутствовала [76b, 77, 78], хотя для других действительно имела место [76b]. Впоследствии было установлено, что *ts*-мутанты групп А, В, С и G интерферируют с вирусами дикого типа [52a]. Интерференция обычно наблюдается при непермиссивной температуре (39°), хотя иногда происходит и в пермиссивных условиях, при 31°C [5, 8]. Степень интерференции весьма высока (50 % и более) и возрастает по мере увеличения множественности заражения интерферирующим *ts*-мутантом [52a].

Комплементация наблюдается между мутантами групп D и Е. Для них обоих характерен пониженный уровень синтеза как одно-, так и двухцепочечной РНК (табл. 20.16). Напротив, интерферирующие мутанты способны к синтезу больших количеств обоих типов РНК.

Анализ реассортантов, полученных в результате «скрещивания» *ts*-мутантов, принадлежащих к интерферирующим (А,

Таблица 20.16. Генетическая карта и свойства *ts*-мутантов реовирусов ¹⁾

Мутант	Мутантный		Синтез			Морфология зрелых вирионов ²⁾	Лизис клетки
	сегмент	белок	дцРНК ²⁾	оцРНК ²⁾	белка ²⁾		
<i>tsA</i>	M2	$\mu 1 \rightarrow \mu 1C$		100	100	Нормальная	Нормальный
<i>tsB</i>	L2	$\lambda 2$	25—50	25—50	25	Отсутствует наружный капсид	Заметно снижен
<i>tsC</i>	S2	$\sigma 2$	0,1	$\simeq 5$	5—10	Пустые вирионы	»
<i>tsD</i>	L1	$\lambda 3$	0,1	$\simeq 5$	10—20	»	Немного снижен
<i>tsE</i>	S3	σNS	1	$\simeq 5$	5—10	Неизвестно	»
<i>tsF</i>	(M3)	(μNS)	50—100	50—100	50—100	Нормальная	Нормальный
<i>tsG</i>	S4	$\sigma 3$	15—25	$\simeq 20$	25	Отсутствует наружный капсид	»
<i>tsH</i> ³⁾	M1	$\mu 2$?	?	?	?	?
<i>tsI</i> ³⁾	L3	$\lambda 1$?	?	?	?	?
<i>tsJ</i>	S1	$\sigma 1$?	?	?	?	?

¹⁾ По данным работ [57, 186, 200, 200a, 229, 230, 231, 232a, 336]. Скобки означают, что данные предположительны.

²⁾ При непермиссивной температуре. Числа указывают уровень синтеза для данного мутанта по отношению к уровню синтеза для вируса дикого типа (%).

³⁾ Выделены недавно и мало изучены.

В, С и G) и к неинтерферирующим (D и E) группам, показал, что способность к интерференции — доминантный признак. Комплементация происходит лишь в том случае, если оба вируса принадлежат к неинтерферирующим группам [52a].

Механизмы интерференции неизвестны, существуют лишь предположения на этот счет. Согласно одному из них, у мутантов интерферирующих групп происходит экспрессия какого-то измененного гена, дефектный продукт которого включается в состав вирионов [5, 8]. По другим данным *ts*-мутанты интерферирующих групп препятствуют синтезу белков вирусов дикого типа, но не подавляют синтеза их мРНК и связывания этих мРНК с полирибосомами [124a].

Реверсия

Иногда наблюдается реверсия *ts*⁻-фенотипа к фенотипу *ts*⁺ (к дикому типу). В принципе она может быть связана с такими изменениями в мутантном гене (интрагенная реверсия) или с мутациями в другом гене (экстрагенная реверсия), которые супрессируют или позволяют обойти дефект, обусловленный исходной мутацией. Используя возвратное скрещивание ревертантов с вирусами дикого типа, удалось показать, что большинство из них на самом деле являются «псевдоревертантами» и что происходит экстрагенная супрессия исходной мутации [229, 230]. Возможный механизм реверсии представлен в табл. 20.17.

Таблица 20.17. Возможный механизм «псевдореверсии» ¹⁾

-
1. Исходный *ts*-мутант → Измененный белок А
(=ΔА)
 2. Взаимодействие ΔА с белком В термоллабильно
ΔА+В → Термоллабильность
 3. Супрессорная мутация → Измененный белок В
(=ΔВ)
 4. ΔА+ΔВ → Термостабильность
-

¹⁾ См. работы [229, 230].

Как предполагает альтернативная гипотеза, реверсия обусловлена мутациями в генах, кодирующих вирусную транскриптазу, которая вносит супрессорные мутации в результате ошибок транскрипции [231].

Делеционные мутанты

При серийном пассировании вируса в культуре ткани появляются делеционные мутанты [209, 251, 284a]. Обычно делеции затрагивают один, реже — несколько сегментов геномной РНК реовируса. Чаще всего затрагивается сегмент L1. Нередки и делеции сегментов L3 и M1. Для размножения делеционных мутантов необходим вирус-помощник. Разработана техника выделения относительно чистых фракций делеционных мутантов из препаратов вируса, основанная на центрифугировании в градиенте плотности [5].

Другие маркеры мутаций

Электрофорез в полиакриламидном геле позволил выделить мутантные реовирусы $\mu 1$ - $\mu 1C$ с измененной (повышенной) подвижностью полипептидов [57a]. Этот маркер сцеплен с *ts*-мутациями группы А [57b].

Реассортация геномов реовирусов

Реассортация геномов двух реовирусов была впервые продемонстрирована на *ts*-мутантах [76b]. Проведенные исследования показали, что генетические маркеры разных сегментов геномной РНК не бывают сцеплены друг с другом и рекомбинация (в отличие от реассортации) не происходит со сколь угодно заметной частотой [78].

Вначале реассортацию анализировали при двухфакторных скрещиваниях. В этих опытах проводили заражение клеток L смесью двух разных *ts*-мутантов при перmissive температуре и анализировали появление реассортантов при nonpermissive. Поскольку часть *ts*-мутантных реовирусов интерферирует с вирусами дикого типа (см. выше), реассортанты были обнаружены лишь в некоторых скрещиваниях. Несмотря на это, в конце концов удалось идентифицировать *ts*-мутации для каждого из десяти сегментов геномной РНК [56, 76b, 229, 230]. Стратегия классификации *ts*-мутантов основана на использовании пар мутантных вирусов: если скрещивание двух *ts*-мутантов не дает в потомстве вирус дикого фенотипа, считается, что оба вируса содержат повреждение в одном и том же сегменте РНК и относятся к одной группе. В противном случае вирусы относят к разным группам *ts*-мутантов.

Если бы реассортация геномов реовирусов была абсолютно случайным процессом, 25 % потомства от смешанного заражения клеток двумя *ts*-мутантами было реассортантным. На самом деле максимальный выход реассортантов составил 20 % и

был получен при скрещивании *tsB* [353] и *tsC* [447]; в других случаях доля реассортантов составляла от 3 % до менее чем 20 % [76b]. Она возрастала при увеличении множественности заражения вплоть до 10 инф. ед./клетка [78]. Максимальный выход реассортантов достигается на ранних сроках заражения и в дальнейшем существенно не меняется. Вероятно, реассортация происходит преимущественно в ходе формирования первых реассортантных геномов [78].

Обнаружение полиморфизма белков $\mu 1$ - $\mu 1C$ [57a, 57b] позволило использовать еще один маркер для генетического анализа (μ^-/μ^+). Были проведены трехфакторные скрещивания, в которых помимо этого маркера использовались *ts*-мутации. Теоретически трехфакторное скрещивание должно иметь следующий вид:

$$tsX^-tsY^+\mu^- \times tsX^+tsY^-\mu^+.$$

Сегрегацию маркера μ^- определяли в реассортантном потомстве генотипа *tsX⁺tsY⁺*. Оказалось, что μ^- сегрегирует с *tsA* в скрещиваниях *tsA* \times *tsD* и независимо от *ts*-мутантных сегментов в скрещиваниях *tsB* \times *tsD* и *tsC* \times *tsD*. Эти результаты позволили картировать маркер μ^- в одном сегменте с *ts*-мутациями группы А. Позже было установлено, что эти мутации локализованы в сегменте М2, который кодирует полипептид $\mu 1$.

Чтобы точно локализовать *ts*-мутации, относящиеся к разным группам реассортации, в определенных сегментах геномной РНК, обычно скрещивали *ts*-мутантные вирусы типа 3 с вирусами дикого типа серотипов 1 и 2. Затем анализировали реассортантное *ts⁺*-потомство в полиакриламидном геле. Такие реассортанты всегда содержали тот сегмент РНК дикого типа, в котором у *ts*-мутанта локализована мутация [200, 231, 232a].

Биологические исследования с реассортантами

Реассортантные реовирусы служат мощным инструментом для определения генетической обусловленности различных свойств реовирусов. Если реовирусы двух серотипов различаются по биологическим свойствам, то для определения генетических основ этих различий можно использовать реассортанты, содержащие различные комбинации генов исходных вирусов. Генотип реассортантов можно точно определить, используя данные по электрофоретической подвижности сегментов геномной РНК. Это позволяет установить происхождение каждого гена. Разные реассортанты можно клонировать из отдельных бляшек и выращивать независимо. При выборе реассортанта для биологических

исследований обычно ориентируются на предполагаемую функцию изучаемого гена (РНК-сегмента). Рассмотрим для простоты один конкретный пример. При изучении роли сегмента S1 наиболее удобными были реассортанты ЗНА1 и 1НАЗ. У ЗНА1 сегмент S1 происходил от реовируса типа 1, а остальные девять — от вируса типа 3. У реассортанта 1НАЗ, напротив, сегмент S1 происходил от вируса типа 3, а остальные — от вируса типа 1. Если различия между реовирусами типов 1 и 3 определяются сегментом S1, то реассортант 1НАЗ должен иметь серотип 3. И наоборот: ЗНА1, несмотря на то что он содержит девять генов вируса типа 3, должен обладать свойствами вируса серотипа 1. Аналогичный подход пригоден и для анализа других генов реовирусов.

Литература

1. Abramczuk J., Vorbrodt A., Rubin D. H., Fields B. N., Koprowski H. (1983). Interactions of preimplantation mouse embryos with reovirus serotypes 1 and 3, *Infect. Immun.*, **42**, 301.
2. Acs G., Klett H., Schonberg M., Christman J., Levin D. H., Silverstein J. C. (1971). Mechanism of reovirus double-stranded RNA synthesis in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **8**, 684.
3. Adams D. J., Ridinger D. N., Spendlove R. S., Barnett B. B. (1982). Protamine precipitation of two reovirus particle types from polluted waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 589.
4. Adams D. J., Spendlove J. C., Spendlove R. S., Barnett B. B. (1982). Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 903.
5. Ahmed R., Fields B. N. (1981). Reassortment of genome segments between reovirus defective interfering particles and infectious virus: construction of temperature-sensitive and attenuated viruses of rescue of mutations from DI particles, *Virology*, **111**, 351.
6. Ahmed R., Fields B. N. (1982). Role of the S4 gene in the establishment of persistent reovirus infection in L cells, *Cell*, **28**, 605.
7. Ahmed R., Graham A. F. (1977). Persistent infections in L cells with temperature-sensitive mutants of reovirus, *J. Virol.*, **23**, 250.
8. Ahmed R., Canning W. M., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Hallum J. V., Fields B. N. (1981). Role of the host cell in persistent viral infection: coevolution of L cells and reovirus during persistent infection, *Cell*, **25**, 325.
9. Ahmed R., Chakraborty P. R., Fields B. N. (1980). Genetic variation during lytic virus infection: high passage stocks of wild-type reovirus contain temperature-sensitive mutants, *J. Virol.*, **34**, 285.
10. Ahmed R., Chakraborty P. R., Graham A. F., Ramig R. F., Fields B. N. (1980). Genetic variation during persistent reovirus infection: presence of extragenically suppressed temperature-sensitive lesions in wild-type virus isolated from persistently infected cells, *J. Virol.*, **34**, 383.
11. Ahmed R., Kauffman R. S., Fields B. N. (1983). Genetic variation during persistent reovirus infection: isolation of cold-sensitive and temperature-sensitive mutants from persistently infected L cells, *Virology*, **131**, 71.
12. Amano Y., Katagari S., Ishida N., Watanabe Y. (1971). Spontaneous degradation of reovirus capsid into subunits, *J. Virol.*, **8**, 805.
13. Anderson N., Doane F. W. (1966). An electron-microscope study of reovirus type 2 in L cells, *Pathol. Bacteriol.*, **92**, 433.

14. Antczak J. B., Chmelo R., Pickup D. J., Joklik W. K. (1982). Sequences at both termini of the ten genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing), *Virology*, **121**, 307.
15. Arnott S., Hutchinson F., Spencer M., Wilkins M. H. F. (1966). X-ray diffraction studies of double helical ribonucleic acid, *Nature*, **211**, 227.
16. Arnott S., Wilkins M. H. F., Fuller W., Langridge R. (1967). Molecular and crystal structures of double-helical RNA, *J. Mol. Biol.*, **27**, 525.
17. Astell C., Silverstein S. C., Levin D. H., Acs G. (1972). Regulation of the reovirus RNA transcriptase by a viral capsomere protein, *Virology*, **48**, 648.
18. Averbach P. (1982). Reovirus and pathogenesis of some forms of chronic mental illness, *Med. Hypotheses*, **8**, 383.
19. Babiss L. E., Luftig R. B., Weatherbee J. A., Weihing R. R., Ray U. R., Fields B. N. (1979). Reovirus serotypes 1 and 3 differ in their in vitro association with microtubules, *J. Virol.*, **30**, 863.
20. Banerjee A. K., Shatkin A. J. (1970). Transcription in vitro by reovirus-associated ribonucleic acid-dependent polymerase, *J. Virol.*, **6**, 1.
21. Banerjee A. K., Shatkin A. J. (1971). Guanosine-5'-diphosphate at the 5' termini of reovirus RNA: evidence for a segmented genome within the virion, *J. Mol. Biol.*, **61**, 643.
22. Banerjee A. K., Ward R., Shatkin A. J. (1971). Initiation of reovirus mRNA synthesis in vitro, *Nature*, **230**, 169.
23. Bangaru B., Morecki R., Glaser J. H., Gartwer L. M., Horwitz M. S. (1980). Comparative studies of biliary atresia in human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice, *Lab. Invest.*, **43**, 456.
24. Bartlett N. M., Gillies S. C., Bullivant S., Bellamy A. R. (1974). Electron microscope study of reovirus reaction cores, *J. Virol.*, **14**, 315.
25. Bell T. M., Ross M. G. R. (1966). Persistent latent infection of human embryonic cells with reovirus type 3, *Nature*, **212**, 412.
26. Bell T. M., Massie A., Ross M. G. R. (1966). Further isolations of reovirus type 3 from cases of Burkitt's lymphoma, *Br. Med. J.*, **2**, 1514.
27. Bellamy A. R., Hole L. V. (1970). Single-standed oligonucleotides from reovirus type 3, *Virology*, **40**, 808.
28. Bellamy A. R., Joklik W. K. (1967). Studies of reovirus RNA. II. Characterization of reovirus messenger RNA and of the genome RNA segments from which it is transcribed, *J. Mol. Biol.*, **29**, 19.
29. Bellamy A. R., Joklik W. K. (1967). Studies on the A-rich RNA of reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1389.
30. Bellamy A. R., Hole L. V., Baguley B. C. (1970). Isolation of the trinucleotide ppGpCpU from reovirus, *Virology*, **42**, 415.
31. Bellamy A. R., Shapiro L., August J. T., Joklik W. K. (1967). Studies on reovirus RNA. I. Characterization of reovirus genome RNA, *J. Mol. Biol.*, **29**, 1.
32. Bellamy A. R., Nichols J. L., Joklik W. K. (1972). Nucleotide sequences of reovirus oligonucleotides: evidence for abortive RNA synthesis during virus maturation, *Nature*, **238**, 49.
33. Bockman D. E., Cooper M. D. (1973). Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer's patches: an electron microscopic study, *Am. J. Anat.*, **136**, 455.
34. Borsa J., Graham A. F. (1968). Reovirus: RNA polymerase activity in purified virions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 895.
35. Borsa J., Copps T. P., Sargent M. D., Long D. G., Chapman J. D. (1973). New intermediate subviral particles in the in vitro uncoating of reovirus virions by chymotrypsin, *J. Virol.*, **11**, 552.
36. Borsa J., Grover J., Chapman J. D. (1970). Presence of nucleoside triphosphate phosphohydrolase activity in purified virions of reovirus, *J. Virol.*, **6**, 295.
37. Borsa J., Morash B. D., Sargent M. D., Copps T. P., Lievaart P. A., Sze-

- kely J. G. (1979). Two modes of entry of reovirus particles into L cells, *J. Gen. Virol.*, **45**, 161.
38. Borsa J., Sargent M. D., Copps T. P., Long D. G., Chapman J. D. (1973). Specific monovalent cation effects on modification of reovirus infectivity by chymotrypsin digestion in vitro, *J. Virol.*, **11**, 1017.
 39. Borsa J., Sargent M. D., Ewing D. D., Einspinner M. (1982). Perturbation of the switch-on of transcriptase activity in intermediate subviral particles from reovirus, *J. Cell. Physiol.*, **112**, 10.
 40. Borsa J., Sargent M. D., Long D. G., Chapman J. D. (1973). Extraordinary effects of specific monovalent cations on activation of reovirus transcriptase by chymotrypsin in vitro, *J. Virol.*, **11**, 207.
 41. Both G. W., Lavi S., Shatkin A. J. (1975). Synthesis of all the gene products of the reovirus genome in vivo and in vitro, *Cell*, **4**, 173.
 42. Branski D., Leberthal E., Faden H., Hatch T. F., Krasner J. (1980). Small intestinal epithelial brush border enzymatic changes in suckling mice infected with reovirus type 3, *Pediatr. Res.*, **14**, 803.
 43. Branski D., Lenenthal E., Faden H., Hatch T. F., Krasner J. (1980). Reovirus type 3 infection in a suckling mouse: the effects on pancreas structure and enzyme content, *Pediatr. Res.*, **14**, 8.
 44. Brendler T., Godefroy-Colburn T., Carlill R. D., Thach R. E. (1981). The role of mRNA competition in regulating translation. II. Development of a quantitative in vitro assay, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11, 747.
 45. Brendler T., Godefroy-Colburn T., Yu S., Thach R. E. (1981). The role of mRNA competition in regulating translation. III. Comparison of in vitro and in vivo results, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11, 755.
 46. Brown E. G., Nibert M. L., Fields B. N. (1983). The L2 gene of reovirus serotype 3 controls the capacity to interfere, accumulate deletions and establish persistent infection. In: *Double-Stranded RNA Viruses*, ed. by R. W. Compans and D. H. L. Bishop, Elsevier, New York.
 47. Brubaker M. M., West B., Ellis R. J. (1964). Human blood group influence on reovirus hemagglutination titers, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**, 1118.
 48. Burstin S. J., Spriggs D. R., Fields B. N. (1982). Evidence for functional domains on the reovirus type 3 hemagglutinin, *Virology*, **117**, 146.
 49. Canning W. M., Fields B. N. (1983). Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells, *Science*, **219**, 987.
 50. Carter C. (1979). Polyadenylation of protein in reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3087.
 - 50a. Carter C., Lin B., Metley M. (1980). Polyadenylation of reovirus proteins, *J. Biol. Chem.*, **255**, 6479.
 - 50b. Carter C., Stolfus C. M., Banerjee A. K., Shatkin A. J. (1974). Origin of reovirus oligo(A), *J. Virol.*, **13**, 1331.
 51. Cashdollar L. W., Esparza J., Hudson G. R., Chmelo R., Lee P. W. K., Joklik W. K. (1982). Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7644.
 52. Caspar D. L. D., Klug A. (1962). Physical properties in the construction of regular viruses, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **27**, 1.
 - 52a. Charkaborty P. R., Ahmed R., Fields B. N. (1979). Genetics of reovirus: the relationship of interference to complementation and reassortment of temperature-sensitive mutants at non-permissive temperatures, *Virology*, **94**, 119.
 53. Chaly N., Johnstone M., Hand R. (1980). Alterations in nuclear structure and function in reovirus-infected cells, *Clin. Invest. Med.*, **2**, 141.
 54. Chang C.-T., Zweerink H. J. (1971). Fate of parental reovirus in infected cell, *Virology*, **46**, 544.
 55. Chow N.-L., Shatkin A. J. (1975). Blocked and unblocked 5' termini in reovirus genome RNA, *J. Virol.*, **15**, 1057.

56. *Cross R. K., Fields B. N.* (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral RNA, *Virology*, **50**, 799.
57. *Cross R. K., Fields B. N.* (1976). Reovirus-specific polypeptides: analysis using discontinuous gel electrophoresis, *J. Virol.*, **19**, 162.
- 57a. *Cross R. K., Fields B. N.* (1976). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: evidence for aberrant $\mu 1$ and $\mu 2$ polypeptide species, *J. Virol.*, **19**, 174.
- 57b. *Cross R. K., Fields B. N.* (1976). Use of an aberrant polypeptide as a marker in three-factor crosses: further evidence for independent reassortment as the mechanism of recombination between temperature-sensitive mutants of reovirus type 3, *Virology*, **74**, 345.
58. *Daher K. A., Samuel C. E.* (1982). Mechanism of interferon action: differential effect of interferon on the synthesis of simian virus 40 and reovirus polypeptides in monkey kidney cells, *Virology*, **117**, 379.
59. *Dales S.* (1963). Association between the spindle apparatus and reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 268.
60. *Dales S., Gomatos P., Hsu K. C.* (1965). The uptake and development of reovirus in strain L cells followed with labelled viral ribonucleic acid and ferritin-antibody conjugates, *Virology*, **25**, 193.
61. *Dalldorf G.* (1957). Brief review of coxsackie viruses in 1956, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **67**, 209.
62. *Deshmukh D. R., Sayed H. I., Pomeroy D. S.* (1968). Avian reoviruses. IV. Relationship to human reoviruses, *Avian Dis.*, **13**, 16.
63. *Detjen B. M., Walden W. E., Thach R. E.* (1982). Translational specificity in reovirus-infected mouse fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **257**, 9855.
64. *Drayna D., Fields B. N.* (1982). Activation and characterization of the reovirus transcriptase: genetic analysis, *J. Virol.*, **41**, 110—118.
65. *Drayna D., Fields B. N.* (1982). Biochemical studies on the mechanism of chemical and physical inactivation of reovirus, *J. Gen. Virol.*, **63**, 161.
66. *Drayna D., Fields B. N.* (1982). Genetic studies on the mechanism of chemical and physical inactivation of virus, *J. Gen. Virol.*, **63**, 149.
67. *Edmonson J. H., Millian S. J., Goodenow M., Lee S. L.* (1970). Persistent viruria with reovirus in a patient treated for Hodgkin's disease in a protected environment, *J. Infect. Dis.*, **121**, 438.
68. *Eggers H. J., Gomatos P. J., Tamm I.* (1962). Agglutination of bovine erythrocytes: a general characteristic of reovirus type 3, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **110**, 879.
69. *Ensminger W. D., Tamm I.* (1969). Cellular DNA and protein synthesis in reovirus-infected cells, *Virology*, **39**, 357.
70. *Ensminger W. D., Tamm I.* (1969). The step in cellular DNA synthesis blocked by reovirus infection, *Virology*, **39**, 935.
71. *Ensminger W. D., Tamm I.* (1970). Inhibition of synchronized cellular deoxyribonucleic acid synthesis during Newcastle disease virus, mengovirus or reovirus infection, *J. Virol.*, **5**, 672.
72. *Epstein R. L., Powers M. L., Weiner H. L.* (1981). Interaction of reovirus with cell surface receptors. III. Reovirus type 3 induces capping of viral receptors on murine lymphocytes, *J. Immunol.*, **127**, 1800.
73. *Fahey J. E., Crawley J. F.* (1954). Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus, *Can. J. Comp. Med.*, **18**, 13.
74. *Farrell J. A., Harvey J. D., Bellamy A. R.* (1974). Biophysical studies of reovirus type 3. I. The molecular weight of reovirus and reovirus cores, *Virology*, **62**, 145.
75. *Faust M., Millward S.* (1974). In vitro methylation of nascent reovirus mRNA by a virion-associated methyl transferase, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1739.
76. *Faust M., Hastings K. E. M., Millward S.* (1975). $M^7G^{5'}\text{-ppp}^{5'}\text{GmpCpUp}$ at the 5' terminus of reovirus messenger RNA, *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1329.

- 76a. *Fields B. N., Greene M. I.* (1982). Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: implications for prevention and treatment, *Nature*, **300**, 19.
- 76b. *Fields B. N., Joklik W. K.* (1969). Isolation and preliminary genetic and biochemical characterization of temperature-sensitive mutants of reovirus, *Virology*, **37**, 335.
77. *Fields B. N., Laskov R., Scharff M. D.* (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: studies on the synthesis of viral peptides, *Virology*, **50**, 209.
78. *Fields B. N., Raine C. S., Baum S. G.* (1971). Temperature-sensitive mutants of reovirus type 3: defects in viral maturation as studied by immunofluorescence and electron microscopy, *Virology*, **43**, 569.
79. *Finberg R., Weiner H. L., Burakoff S. J., Fields B. N.* (1981). Type-specific reovirus anti-serum blocks the cytotoxic T-cell-target cell interaction: evidence for the association of the viral hemagglutinin of a non-enveloped virus with the cell surface, *Infect. Immun.*, **31**, 646.
80. *Finberg R., Spriggs D. R., Fields B. N.* (1982). Host immune response to reovirus: CTL recognize the major neutralization domain of the viral hemagglutinin, *J. Immunol.*, **129**, 2235.
81. *Finberg R., Weiner H. L., Fields B. N., Benacerraf B., Burakoff S. J.* (1979). Generation of cytolytic T lymphocytes after reovirus infection: role of S1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 442.
82. *Floyd W. D., Stone M. P., Joklik W. K.* (1974). Separation of single-stranded ribonucleic acids by acrylamide-agarose-urea gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **59**, 599.
83. *Fontana A., Weiner H. L.* (1980). Interaction of reovirus with cell surface receptors. II. Generation of suppressor T cells by the hemagglutinin of reovirus type 3, *J. Immunol.*, **125**, 2660.
84. *Fouad M. T. A., Engler R.* (1966). Density gradient centrifugation of reovirus prototypes 1, 2 and 3, *Z. Naturforsch.*, **21B**, 706.
85. *Franklin R. M.* (1961). Comparison of assays for mengovirus and reovirus-3, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **107**, 651.
86. *Furuichi Y., Shatkin A. J.* (1977). 5'-Termini of reovirus mRNA: ability of viral cores to form caps post-transcriptionally, *Virology*, **77**, 566.
87. *Furuichi Y., LaFiandra A., Shatkin A. J.* (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability, *Nature*, **266**, 235.
88. *Furuichi Y., Morgan M., Muthukrishnan S., Shatkin A. J.* (1975). Reovirus messenger RNA contains a methylated blocked 5'-terminal structure: M⁷G(5')ppp(5')GmpCp-, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 362.
89. *Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J.* (1975). 5'-Terminal M⁷G(5')ppp(5')Gmp in vivo: identification in reovirus genome RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 742.
90. *Furuichi Y., Muthukrishnan S., Tomasz J., Shatkin A. J.* (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5-terminal blocked and methylated sequence, M⁷GpppGmpC, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5043.
91. *Gaillard R. K., Joklik W. K.* (1982). Quantitation of the relatedness of the genomes of reovirus serotype, 1, 2 and 3 at the gene level, *Virology*, **123**, 152.
92. *Gaillard R. K., Li J. K.-K., Keene J. D., Joklik W. K.* (1982). The sequences of the termini of four genes of the three reovirus serotypes, *Virology*, **121**, 320.
93. *Gard G., Compans R. W.* (1970). Structure and cytopathic effects of Nelson Bay virus, *J. Virol.*, **6**, 100.
94. *Gard G., Marshall I. D.* (1973). Nelson Bay virus: a novel reovirus, *Arch. Virol.*, **43**, 34.
95. *Gelb L. D., Lerner A. M.* (1965). Reovirus hemagglutination: inhibition by N-acetyl-D-glucosamine, *Science*, **147**, 404.

96. *Gelfand H. M.* (1959). The incidence of certain endemic enteric virus infections in southern Louisiana, *South. Med. J.*, **52**, 819.
97. *Gentsch J. R., Fields B. N.* (1981). Tryptic peptide analysis of outer capsid polypeptides of mammalian reovirus serotypes 1, 2 and 3, *J. Virol.*, **38**, 208.
98. *Gentsch J. R., Fields B. N.* (1984). Genetic diversity in natural populations of mammalian reoviruses: tryptic peptide analysis of outer capsid polypeptides of murine, bovine, and human type 1 and 3 reovirus strains, *J. Virol.*, **49**, 641.
99. *Gillies S., Bullivant S., Bellamy A. R.* (1971). Viral RNA polymerase: electron microscopy of reovirus reaction cores, *Science*, **174**, 694.
100. *Glass S. E., Naqui S. A., Hall C. F., Kerr K. M.* (1973). Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens, *Avian Dis.*, **17**, 415.
101. *Gomatos P. J.* (1970). Comparison of the virion polymerase of reovirus with the enzyme purified from reovirus-infected cells, *J. Virol.*, **6**, 610.
102. *Gomatos P. J., Tamm I.* (1963). Animal and plant viruses with double-helical RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 878.
103. *Gomatos P. J., Tamm I.* (1963). Base composition of the RNA of a reovirus variant, *Science*, **140**, 997.
104. *Gomatos P. J., Tamm I.* (1963). Macromolecular synthesis in reovirus-infected L cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 651.
105. *Gomatos P. J., Stoockenius W.* (1964). Electron microscope studies on reovirus RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1449.
106. *Gomatos P. J., Prakash O., Stamatos N. M.* (1981). Small reovirus particles composed solely of sigma NS with specificity for binding different nucleic acids, *J. Virol.*, **39**, 115.
107. *Gomatos P. J., Tamm I., Dales S., Franklin R. M.* (1962). Reovirus type 3: physical characteristics and interaction with L cells, *Virology*, **17**, 441.
108. *Graziadei W. D., III, Lengyel P.* (1972). Translation of in vitro synthesized reovirus messenger RNA into proteins of the size of reovirus capsid proteins in a mouse L cell extract, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1816.
109. *Graziadei W. D., III, Roy D., Konigsberg W., Lengyel P.* (1973). Translation of reovirus RNA synthesized in vitro into reovirus proteins in a mouse L cell extract, *Arch. Biochem., Biophys.*, **158**, 266.
110. *Greene M. I., Weiner H. L.* (1980). Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. II. Induction of tolerance and suppressor T cells to viral specific gene products, *J. Immunol.*, **125**, 283.
111. *Gupta S. L., Holmes S. L., Mehra L. L.* (1982). Interferon action against reovirus: activation of interferon induced protein kinase in mouse L929 cells upon reovirus infection, *Virology*, **120**, 495.
112. *Hand R., Tamm I.* (1971). Reovirus: analysis of proteins from released and cell-associated virus, *J. Gen. Virol.*, **12**, 121.
113. *Hand R., Tamm I.* (1974). Initiation of DNA synthesis in mammalian cells and its inhibition by reovirus infection, *J. Mol. Biol.*, **82**, 175.
114. *Harvey J. D., Farrell J. A., Bellamy A. R.* (1974). Biophysical studies of reovirus type 3. II. Properties of the hydrated particle, *Virology*, **62**, 154.
115. *Hassan S. A., Rabin E. R., Melnick J. L.* (1965). Reovirus myocarditis in mice: an electron microscopic, immunofluorescent, and virus assay study, *Exp. Mol. Pathol.*, **4**, 66.
116. *Hastings K. E. M., Millward S.* (1978). Nucleotide sequences at the 5'-termini of reovirus mRNA's, *J. Virol.*, **28**, 490.
117. *Hastings K. E. M., Millward S.* (1981). Similar sets of terminal oligonucleotides from reovirus double-stranded RNA and viral messenger RNA synthesized in vitro, *Can. J. Biochem.*, **59**, 151.
118. *Hayes E. C., Lee P. W. K., Miller S. E., Joklik W. K.* (1981). The interaction of a series of hybridoma IgGs with reovirus particles: demonstration that the core protein $\lambda 2$ is exposed on the particle surface, *Virology*, **108**, 147.

119. *Henderson D. R., Joklik W. K.* (1978). The mechanism of interferon induction by UV-irradiated reovirus, *Virology*, **91**, 389.
120. *Hiatt C. W.* (1960). Photodynamic inactivation of viruses, *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **23**, 66.
121. *Hrdy D. B., Rosen L., Fields B. N.* (1979). Polymorphism of the migration of double-stranded RNA segments of reovirus isolated from humans, cattle, and mice, *J. Virol.*, **31**, 104.
122. *Hrdy D. B., Rubin D. N., Fields B. N.* (1982). Molecular basis of reovirus neurovirulence: role of the M2 gene in avirulence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1298.
123. *Huismans H., Joklik W. K.* (1976). Reovirus-coded polypeptides in infected cells: isolation of two native monomeric polypeptides with high affinity for single-stranded and double-stranded RNA, respectively, *Virology*, **70**, 411.
124. *Iglewski W. J., Franklin R. M.* (1967). Purification and properties of reovirus ribonucleic acid, *J. Virol.*, **1**, 302.
- 124a. *Ikegami N., Gomatos P. J.* (1968). Temperature-sensitive conditional lethal mutants of reovirus 3, *Virology*, **36**, 447.
125. *Ito Y., Joklik W. K.* (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus. I. Patterns of gene expression by mutants of groups C, D, and E. *Virology*, **50**, 189.
126. *Ito Y., Joklik W. K.* (1972). Temperature-sensitive mutants of reovirus. II. Anomalous electrophoretic migration behavior of certain hybrid RNA molecules composed of mutant plus strands and wild-type minus strands, *Virology*, **50**, 202.
127. *Jackson G. G., Muldoon R. L.* (1973). Viruses causing respiratory infection in man. IV. Reoviruses and adenoviruses, *J. Infect. Dis.*, **128**, 811.
128. *Jensen A. B., Rabin E. R., Phillips C. A., Melnick J. L.* (1965). Reovirus encephalitis in newborn mice: an electron microscopic and virus assay study, *Am. J. Pathol.*, **47**, 223.
129. *Joklik W. K.* (1970). The molecular biology of reovirus, *J. Cell. Physiol.*, **76**, 289.
130. *Joklik W. K.* (1972). Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions, *Virology*, **49**, 700.
131. *Joklik W. K.* (1974). Reproduction of Reoviridae. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 2, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 231—334, Plenum, New York.
132. *Joklik W. K.* (1981). Structure and function of the reovirus genome, *Microbiol. Rev.*, **45**, 483.
133. *Joklik W. K.* (1983). The reovirus particle. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 9—79, Plenum, New York.
134. *Joklik W. K., Shehel J. J., Zweerink H. J.* (1970). The transcription of the reovirus genome, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **35**, 791.
135. *Jordan L. E., Mayor H. D.* (1962). The fine structure of reovirus, a new member of the icosahedral series, *Virology*, **17**, 597.
136. *Joske R. A., Keall D. D., Leak P. J., Stanley N. F., Walters M. N.* (1964). Hepatitis-encephalitis in humans with reovirus infection, *Arch. Intern. Med.*, **113**, 811.
137. *Joske R. A., Leak P. J., Papadimitriou J. M., Stanley N. F., Walters M.* (1966). Murine infection with reovirus. IV. Late chronic disease and the induction of lymphoma after reovirus type 3 infection, *Br. J. Exp. Pathol.*, **47**, 337.
138. *Kapuler A. M.* (1970). An extraordinary temperature dependence of the reovirus transcriptase, *Biochemistry*, **9**, 4453.
139. *Kapuler A. M., Mendelsohn N., Klett H., Acs G.* (1970). Four base-specified nucleoside 5'-triphosphatases in the subviral core of reovirus, *Nature*, **225**, 1209.
140. *Kaufman R. S., Ahmed R., Fields B. N.* (1983). Selection of a mutant S1

- gene during reovirus persistent infection of L cells: role in maintenance of the persistent state, *Virology*, **131**, 79.
141. Kauffman R. S., Wolf L. J., Finberg R., Trier J. S., Fields B. N. (1983). The sigma 1 protein determines the extent of spread of reovirus from the gastrointestinal tracts of mice, *Virology*, **124**, 403.
 142. Kawamura H., Tsubahara H. (1966). Common antigenicity of avian reoviruses, *Nat. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo), **6**, 187.
 143. Kawamura H., Shimizu F., Maeda M., Tsubahara H. (1965). Avian reovirus: its properties and serological classification, *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo), **5**, 115.
 144. Kilham L., Margolis G. (1969). Hydrocephalus in hamsters, ferrets, rats and mice following inoculations with reovirus type 1, *Lab. Invest.*, **21**, 183.
 145. Koide F., Suzuka L., Sekiguchi K. (1968). Some properties of an adenine-rich polynucleotide fragment from the avian reovirus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 95.
 146. Kozak M. (1977). Nucleotide sequences of 5'-terminal ribosome-protected initiation regions from two reovirus messages, *Nature*, **269**, 390.
 147. Kozak M. (1977). Sequences of two 5'-terminal ribosome-protected fragments from reovirus messenger RNAs, *J. Mol. Biol.*, **112**, 75.
 148. Kozak M. (1982). Sequences of ribosome-binding sites from the large size class of reovirus mRNA, *J. Virol.*, **42**, 467.
 149. Kozak M., Shatkin A. J. (1976). Characterization of the ribosome-protected fragments from reovirus messenger mRNA, *J. Biol. Chem.*, **251**, 4259.
 150. Kozak M., Shatkin A. J. (1977). Sequences and properties of 2 ribosome binding sites from the small size class of reovirus messenger RNA, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6895.
 151. Krainer L., Aronson B. E. (1959). Disseminated encephalomyelitis in humans with recovery of hepatoencephalitis virus, *J. Neuropathol.*, **18**, 339.
 152. Krystal G., Perrault J., Graham A. F. (1976). Evidence for a glycoprotein in reovirus, *Virology*, **72**, 308.
 153. Krystal G., Winn P., Willward S., Sakuma S. (1975). Evidence for phosphoproteins in reovirus, *Virology*, **64**, 505.
 154. Kudo H., Graham A. F. (1966). Selective inhibition of reovirus induced RNA in L cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 150.
 155. Lai M., Joklik W. K. (1973). The induction of interferon by temperature-sensitive mutants of reovirus, UV-irradiated reovirus, and subviral reovirus particles, *Virology*, **51**, 191.
 156. Langberg S. R., Moss B. (1981). Post-transcriptional modifications of mRNA: purification and characterization of cap I and cap II RNA (nucleoside-2'-)-methyltransferases from HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **256**, 10054.
 157. Langridge R., Gomatos P. J. (1963). The structure of RNA, *Science*, **141**, 694.
 158. Lau R. Y., Van Alstyne D., Berckmans R., Graham A. F. (1975). Synthesis of reovirus-specific polypeptides in cells pretreated with cycloheximide, *J. Virol.*, **16**, 470.
 159. Lee P. W. K., Hayes E. C., Joklik W. K. (1981). Characterization of anti-reovirus immunoglobulins secreted by cloned hybridoma cell lines, *Virology*, **108**, 134.
 160. Lee P. W. K., Hayes E. C., Joklik W. K. (1981). Protein $\sigma 1$ is the reovirus cell attachment protein, *Virology*, **108**, 156.
 161. Leers W. D., Royce K. R., (1966). A survey of reovirus antibodies in sera of urban children, *Can. Med. Assoc. J.*, **94**, 1040.
 162. Lendrum A. C. (1947). The phloxin-tartrazine method as a general histological stain and for the demonstration of inclusion bodies, *J. Pathol. Bacteriol.*, **59**, 399.
 163. Lerner A. M., Bailey E. J., Tillotson J. R. (1966). Enterovirus hemagglutination: inhibition by several enzymes and sugars, *J. Immunol.*, **95**, 1111.

164. *Lerner A. M., Miranda O. R.* (1968). Cellular interactions of several enteroviruses and a reovirus after treatment with sodium borohydride or carbohydrazes, *Virology*, **36**, 277.
165. *Letvin N. L., Kauffman R. S., Finberg R.* (1981). T lymphocyte immunity to reovirus: cellular requirements for generation and role in clearance of primary infections, *J. Immunol.*, **127**, 2334.
166. *Levin D. H., Mendelsohn N., Schonberg M., Klett H., Silverstein S., Kapuler A. M.* (1970). Properties of RNA transcriptase in reovirus subviral particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 890.
167. *Levin K. H., Samuel C. E.* (1980). Biosynthesis of reovirus-specified polypeptides: purification and characterization of the small-sized class mRNAs of reovirus type 3: coding assignments and translational efficiencies, *Virology*, **106**, 1.
168. *Levy J. A., Tanabe E., Curnen E. C.* (1968). Occurrence of reovirus antibodies in healthy African children and in children with Burkitt's lymphoma, *Cancer*, **21**, 53.
169. *Lewandowski L. J., Traynor B. L.* (1972). Comparison of the structure and polypeptide composition of three double-stranded ribonucleic acid-containing viruses (diplornaviruses): cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus, and reovirus, *J. Virol.*, **10**, 1053.
170. *Li J. K.-K., Keene J. D., Scheible P. P., Joklik W. K.* (1980). Nature of the 3'-terminal sequence of the plus and minus strands of the S1 gene of the reovirus serotype 1, 2 and 3, *Virology*, **105**, 41.
171. *Lohn P. C., Shatkin A. J.* (1968). Structural proteins of reovirus, *J. Virol.*, **2**, 1353.
172. *Loh P. C., Hohlt H. R., Soergel M.* (1965). Fine structure of reovirus type 2, *J. Bacteriol.*, **89**, 1140.
173. *Long W. F., Burke D. C.* (1971). A comparison of interferon induction by reovirus RNA and synthetic double-stranded peptides, *J. Gen. Virol.*, **12**, 1.
174. *Lou T. Y., Wenner H. A.* (1963). Natural and experimental infections of dogs with reovirus type 1: pathogenicity of the strain for other animals, *Am. J. Hyg.*, **77**, 293.
175. *Luftig R. B., Kilham S., Hay A. J., Zweerink H. J., Joklik W. K.* (1972). An ultrastructure study of virions and cores of reovirus type 3, *Virology*, **48**, 170.
176. *Maratos-Flier E., Kahn C. R., Springgs D. R., Fields B. N.* (1983). Specific plasma membrane receptors for reovirus on rat pituitary cells in culture, *J. Clin. Invest.*, **72**, 617.
177. *Margolis G., Kilham L.* (1969). Hydrocephalus in hamsters, ferrets, rats and mice following inoculations with reovirus type 1. II. Pathologic studies, *Lab. Invest.*, **21**, 189.
178. *Margolis G., Kilham L., Gonatos N.* (1971). Reovirus type III encephalitis: observations of virus-cell interactions in neural tissues. I. Light microscopy studies, *Lab. Invest.*, **24**, 91.
179. *Martin S. A., Pett D. M., Zweerink H. J.* (1973). Studies on the topography of reovirus and bluetongue virus capsid proteins, *J. Virol.*, **12**, 194.
180. *Martinson H. G., Lewandowski L. J.* (1975). Sequence homology studies between double-stranded RNA genomes of cytoplasmic polyhedrosis virus, wound tumor virus and reovirus strains 1, 2 and 3, *Intervirology*, **4**, 91.
181. *Massie A., Ross M. G., Williams M. C.* (1964). Isolation of a reovirus from a case of Burkitt's lymphoma, *Br. Med. J.*, **1**, 1212.
182. *Masters C., Alpers M., Kakulas B.* (1977). Pathogenesis of reovirus type 1 hydrocephalus in mice: significance of aqueductal changes, *Arch. Neurol.*, **34**, 18.
183. *McClain M. E., Spendlove R. S.* (1966). Multiplicity reactivation of reovirus particles after exposure to ultraviolet light, *J. Bacteriol.*, **92**, 1422.

184. McClain M. E., Spendlove R. S., Lennette E. N. (1967). Infectivity assay of reoviruses: comparison of immunofluorescent cell count and plaque methods, *J. Immunol.*, **98**, 1301.
185. McCrae M. A. (1981). Terminal structure of reovirus RNAs, *J. Gen. Virol.*, **55**, 393.
186. McCrae M. A., Joklik W. K. (1978). The nature of the polypeptide encoded by each of the ten double-stranded RNA segments of reovirus type 3, *Virology*, **89**, 578.
187. McDowell M. J., Joklik W. K. (1971). An in vitro protein synthesizing system from mouse L fibroblasts infected with reovirus, *Virology*, **45**, 724.
188. McDowell M. J., Joklik W. K., Villa-Komaroff L., Lodisch H. F. (1972). Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro reovirus polypeptides by several mammalian cell-free extracts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2649.
189. Metcalf P. (1982). The symmetry of the reovirus outer shell, *J. Ultrastruct. Res.*, **78**, 292.
190. Millward S., Graham A. F. (1970). Structural studies on reovirus: discontinuities in the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 422.
191. Miura K.-I., Watanabe K., Sugiura M., Shatkin A. J. (1974). The 5'-terminal nucleotide sequence of the double-stranded RNA of human reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3979.
192. Miyamoto N. G., Samuel C. E. (1980). Mechanism of interferon action: interferon-mediated inhibition of reovirus mRNA translation in the absence of detectable mRNA degradation but in the presence of protein phosphorylation, *Virology*, **107**, 461.
193. Morecki R., Glaser J. H., Cho S., Balistreri W. F., Horwitz M. S. (1982). Biliary atresia and reovirus type 3 infection, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 481.
194. Morgan E. M., Zweerink H. J. (1974). Reovirus morphogenesis: core-like particles in cells infected at 39° with wild-type reovirus and temperature-sensitive mutants of groups B and G, *Virology*, **59**, 556.
195. Morgan E. M., Zweerink H. J. (1975). Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus infected cells, *Virology*, **68**, 455.
196. Morgan E. M., Zweerink H. J. (1977). Characterization of the double-stranded RNA in replicase particles in reovirus infected cells, *Virology*, **77**, 421.
197. Morgan E. M., Kingsbury D. W. (1980). Pyridoxal phosphate as a probe of reovirus transcriptase, *Biochemistry*, **19**, 484.
198. Morgan E. M., Kingsbury D. W. (1981). Reovirus enzymes that modify messenger RNA are inhibited by perturbation of the lambda proteins, *Virology*, **113**, 565.
199. Müller G., Schneider C. C., Peters D. (1966). Zur Feinstruktur des reovirus (Typ. 3), *Arch. Ges. Virusforsch.*, **19**, 110.
200. Mustoe T. A., Ramig R. F., Sharpe A. H., Fields B. N. (1978). A genetic map of reovirus. III. Assignment of the double-stranded RNA mutant groups A, B, and G to genome segments, *Virology*, **85**, 545.
- 200a. Mustoe T. A., Ramig R. F., Sharpe A. H., Fields B. N. (1978). Genetics of reovirus: identification of the dsRNA segments encoding the polypeptides of the μ and σ size classes, *Virology*, **89**, 594.
201. Muthukrishnan S., Shatkin A. J. (1975). Reovirus genome RNA segments: resistance to S1 nuclease, *Virology*, **64**, 96.
202. Nichols J. L., Bellamy A. R., Joklik W. K. (1972). Identification of the nucleotide sequences of the oligonucleotides present in reovirions, *Virology*, **49**, 562.
203. Nichols J. L., Hay A. J., Joklik W. K. (1972). 5'-Terminal nucleotide sequence of reovirus mRNA synthesized in vitro, *Nature*, **235**, 105.
204. Nielsen S. L., Baringer J. R. (1972). Reovirus-induced aqueductal stenosis in hamsters: phase contacts and electron microscopic studies, *Lab. Invest.*, **27**, 531.

205. *Nilsen T. W., Maroney P. A., Baglioni C.* (1982). Inhibition of protein synthesis in reovirus-infected HeLa cells with elevated levels of vinterferon-induced protein kinase activity, *J. Biol. Chem.*, **257**, 14593.
206. *Nilsen T. W., Maroney P. A., Baglioni C.* (1982). Synthesis of (2'-5')oligoadenylate and activation of an endoribonuclease in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus, *J. Virol.*, **42**, 1039.
207. *Nilsen T. W., Maroney P. A., Baglioni C.* (1983). Maintenance of protein synthesis in spite of mRNA breakdown in interferon-treated HeLa cells infected with reovirus, *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 64.
208. *Nonoyama M., Millward S., Graham A. F.* (1974). Control of transcription of the reovirus genome, *Nucleic Acids Res.*, **1**, 373.
209. *Nonoyama M., Watanabe Y., Graham A. F.* (1970). Defective virions in reovirus, *J. Virol.*, **6**, 226.
210. *Oie H. K., Loh P. C.* (1971). Reovirus type 2: induction of viral resistance and interferon production in fathead minnow cell, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **136**, 369.
211. *Onodera T., Jenson A. B., Yoon J.-W., Notkins A. L.* (1978). Virus-induced diabetes mellitus: reovirus infection of pancreatic cells in mice, *Science*, **201**, 529.
212. *Onodera T., Toniolo A., Ray U. R., Jensen A. B., Knazek R. A., Notkins A. L.* (1981). Virus-induced diabetes mellitus. XX. Polyendocrinopathy and autoimmunity, *J. Exp. Med.*, **153**, 1457.
213. *Owen R. L.* (1977). Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study, *Gastroenterology*, **72**, 440.
214. *Owen R. L., Jones A. L.* (1974). Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles, *Gastroenterology*, **66**, 189.
215. *Palmer E. L., Martin M. L.* (1977). The fine structure of the capsid of reovirus type 3, *Virology*, **76**, 109.
216. *Papadimitriou J. M.* (1965). Electron micrographic features of acute murine reovirus hepatitis, *Am. J. Pathol.*, **47**, 565.
217. *Papadimitriou J. M.* (1966). Ultrastructural features of chronic murine hepatitis after reovirus type 3 infection, *Br. J. Exp. Pathol.*, **47**, 624.
218. *Papadimitriou J. M.* (1968). The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection, *Am. J. Pathol.*, **52**, 595.
219. *Papadimitriou J. M.* (1979). An analysis of the peritonitis in acute murine reovirus infection, *Pathology*, **11**, 447.
220. *Pett D. M., Vanaman T. C., Joklik W. K.* (1973). Studies on the amino and carboxyl-terminal amino acid sequences of reovirus capsid polypeptides, *Virology*, **52**, 174.
221. *Phillips P. A., Alpers M. P., Stanley N. F.* (1970). Hydrocephalus in mice inoculated neonatally by the oronasal route with reovirus type 1, *Science*, **168**, 858.
222. *Rh Phillips P. A., Keast D., Papadimitriou J. M., Walters M. N., Stanley N. F.* (1969). Chronic obstructive jaundice induced by reovirus type 3 in weanling mice, *Pathology*, **1**, 193.
223. *Phillips P. A., Keast D., Walters M., Stanley N. F.* (1971). Murine lymphoma induced by reovirus 3, *Pathology*, **3**, 133.
224. *Prevec L., Watanabe Y., Gaunt C. J., Graham A. F.* (1968). Transcription of the genomes of type 1 and type 3 reoviruses, *J. Virol.*, **2**, 289.
225. *Priscott P. K.* (1983). The growth of reovirus 3 in cultured rat embryos and implications for human reproductive failure, *Br. J. Exp. Pathol.*, **64**, 467.
226. *Raine C. S., Fields B. N.* (1973). Ultrastructural features of reovirus type 3 encephalitis, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **32**, 19.
227. *Raine C. S., Fields B. N.* (1974). Neurotropic virus-host relationship altera-

- tions due to variation in viral genome as studied by electron microscopy, *Am. J. Pathol.*, **75**, 119.
228. *Ralph S. J., Harvey J. D., Bellamy A. R.* (1980). Subunit structure of the reovirus spike, *J. Virol.*, **36**, 894.
 229. *Ramig R. F., Fields B. N.* (1977). Reoviruses. In: *The Molecular Biology of Animal Virus*, Vol. I, ed. by D. P. Nayak, pp. 383—433, Marcel Dekker, New York.
 230. *Ramig R., Fields B. N.* (1983). Genetics of reovirus. In: *The Reoviridae*, ed. by W. Joklik, pp. 197—228, Plenum, New York.
 231. *Ramig R. F., Ahmed R., Fields B. N.* (1983). A genetic map of reovirus: assignment of the newly defined mutant groups H, I, and J. to genome segments, *Virology*, **125**, 299.
 232. *Ramig R. F., Cross R. K., Fields B. N.* (1977). Genome RNAs and polypeptides of reovirus serotypes 1, 2 and 3, *J. Virol.*, **22**, 726.
 - 232a. *Ramig R. F., Mustoe T. A., Sharpe A. H., Fields B. N.* (1978). A genetic map of reovirus. II. Assignment of the double-stranded RNA-negative mutant groups C, D, and E genome segments, *Virology*, **85**, 531.
 233. *Ramos-Alvarez M., Sabin A. B.* (1954). Characteristics of poliomyelitis and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 655.
 234. *Rauth A. M.* (1965). The physical state of viral nucleic acid and the sensitive of viruses to ultraviolet light, *Biophys. J.*, **5**, 257.
 235. *Rhim J. S., Jordan L. E., Mayor H. D.* (1962). Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture, *Virology*, **17**, 342.
 236. *Rhim J. S., Smith K. O., Melnick J. L.* (1961). Complete and coreless forms of reovirus (ECHO 10): ratio of number of virus particles to infective units in the one-step growth cycle, *Virology*, **15**, 428.
 237. *Richardson M. A., Furuichi Y.* (1983). Nucleotide sequence of reovirus genome segment S₃, encoding unstructural protein sigma NS, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6399.
 238. *Ridinger D. N., Spendlove R. S., Barnett B. B., George D. B., Roth J. C.* (1982). Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 740.
 239. *Rosen L.* (1960). Serologic groupings of reovirus by hemagglutination-inhibition, *Am. J. Hyg.*, **71**, 242.
 240. *Rosen L.* (1962). Reoviruses in animals other than man, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **101**, 461.
 241. *Rosen L.* (1969). Reoviruses. In: *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*, ed. by E. H. Lennette and N. J. Schmidt, American Public Health Association, New York.
 242. *Rosen L., Evans H. E., Spickard A.* (1963). Reovirus infections in human volunteers, *Am. J. Hyg.*, **77**, 29.
 243. *Rosen L., Hovis J. F., Mastrota F. M., Bell J. A., Huebner R. J.* (1960). An outbreak of infection with a type 1 reovirus among children in an institution, *Am. J. Hyg.*, **71**, 266.
 244. *Roy D., Grazidei W. D., Lengyel P., Konisberg W.* (1972). Amino terminal sequences of several reovirus type 3 capsid proteins are identical, *Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1066.
 245. *Rubin D. H., Fields B. N.* (1980). Molecular basis of reovirus virulence: role of the M2 gene, *J. Exp. Med.*, **152**, 853.
 246. *Rubin D., Weiner H. L., Fields B. N., Greene M. I.* (1981). Immunologic tolerance after oral administration of reovirus: requirement for two viral gene products for tolerance induction, *J. Immunol.*, **127**, 1697.
 247. *Sabin A. B.* (1959). Reoviruses, *Science*, **130**, 1387.

248. Sabin A. B. (1957). Viruses in search of disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **67**, 250.
249. Sakuma S., Watanabe Y. (1972). Reovirus replicase-directed synthesis of double-stranded ribonucleic acid, *J. Virol.*, **10**, 628.
250. Schonberg M., Silverstein S. C., Levin D. H., Acs G. (1971). Asynchronous synthesis of the complementary strands of the reovirus genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 505.
251. Schuerch A. R., Matshuhisa I., Joklik W. K. (1974). Temperature-sensitive mutants of reovirus. VI. Mutants ts447 and ts556 particles lack one or two L genome RNA segments, *Intervirology*, **3**, 36.
252. Schuerch A. R., Mitchell W. R., Joklik W. K. (1975). Isolation of intact individual species of single- and double-stranded RNA after fractionation by polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **65**, 331.
253. Scott F. W., Kahn D. E., Gillespie J. H. (1970). Feline reovirus: isolation, characterization and pathogenicity of a feline reovirus, *Am. J. Vet. Res.*, **71**, 11.
254. Sharpe A. H., Fields B. N. (1981). Reovirus inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 gene, *J. Virol.*, **38**, 389.
255. Sharpe A. H., Fields B. N. (1982). Reovirus inhibition of cellular RNA and protein synthesis; role of the S4 gene, *Virology*, **122**, 381.
256. Sharpe A. H., Fields B. N. (1983). Pathogenesis of reovirus infection: In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 229—285, Plenum, New York.
257. Sharpe A. H., Chen L. B., Fields B. N. (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells, *Virology*, **120**, 399.
258. Sharpe A. H., Ramig R. F., Mustoe T. A., Fields B. N. (1978). A genetic map of reovirus. I. Correlation of genome RNAs between serotypes 1, 2, and 3, *Virology*, **84**, 63.
259. Shatkin A. J. (1965). Inactivity of purified reovirus RNA as a template for *E. coli* polymerases in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1721.
260. Shatkin A. J. (1974). Methylated messenger RNA synthesis in vitro by purified reovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3204.
261. Shatkin A. J., Banerjee A. K. (1970). In vitro transcription of double-stranded RNA by reovirus-associated RNA polymerase, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 781.
262. Shatkin A. J., Kozak M. (1983). Biochemical aspects of reovirus transcription and translation. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 79—106, Plenum, New York.
263. Shatkin A. J., LaFiandra A. J. (1972). Transcription by infectious subviral particles of reovirus, *J. Virol.*, **10**, 698.
264. Shatkin A. J., Sipe J. D. (1968). Single-stranded adenine-rich RNA from purified reoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 246.
265. Shatkin A. J., Sipe J. D. (1968). RNA polymerase activity in purified reoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 1462.
266. Shatkin A. J., Sipe J. D., Loh P. C. (1968). Separation of 10 reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Virol.*, **2**, 986.
267. Shaw J. E., Cox D. C. (1973). Early inhibition of cellular DNA synthesis by high multiplicities of infections and UV-irradiated reovirus, *J. Virol.*, **12**, 704.
268. Shelton I. H., Kasupski G. J., Jr., Oblin C., Hand R. (1981). DNA-binding of a nonstructural reovirus protein, *Can. J. Biochem.*, **59**, 122.
269. Silverstein S. C., Dales S. (1968). The penetration of reovirus RNA and inhibition of its genetic function in L-strain fibroblasts, *J. Cell. Biol.*, **36**, 197.
270. Silverstein S. C., Schur P. H. (1970). Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells, *Virology*, **41**, 564.
271. Silverstein S. G., Astell C., Christman J., Klett H., Acs G. (1974). Synthesis of reovirus oligoadenylic acid in vivo and in vitro, *J. Virol.*, **13**, 740.

272. Silverstein S. C., Astell C., Levin D. H., Schonberg M., Acs G. (1972). The mechanisms of reovirus uncoating and gene activation in vitro, *Virology*, **47**, 797.
273. Silverstein S. C., Christman J. K., Acs G. (1976). The reovirus replication cycle, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 375.
274. Silverstein S. C., Levin D. H., Schonberg M., Acs G. (1970). The reovirus replicative cycle: conservation of parental RNA and protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**, 275.
275. Simmons D. G., Colwell W. M., Muse K. E., Brewer C. E. (1972). Isolation and characterization of an enteric reovirus causing high mortality in turkey poults, *Avian Dis.*, **16**, 1094.
276. Simpson D. I. H., Haddow A. J., Woodall J. P., Williams M. C., Bell T. M. (1965). Attempt to transmit reovirus type 3 by the bite of *Aedes (stegomyia) aegypti* Linnaeus, *E. Afr. Med. J.*, **42**, 708.
277. Skehel J. J., Joklik W. K. (1969). Studies on the in vitro transcription of reovirus RNA catalyzed by reovirus cores, *Virology*, **39**, 822.
278. Skup D., Millward S. (1977). Highly efficient translation of messenger RNA in cell-free extracts prepared from L-cells, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3581.
279. Skup D., Millward S. (1980). Reovirus-induced modification of cap dependent translation in infected L cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 152.
280. Skup D., Millward S. (1980). mRNA capping enzymes are masked in reovirus progeny subviral particles, *J. Virol.*, **34**, 490.
281. Skup D., Zarbi H., Millward S. (1981). Regulation of translation in L-cells infected with reovirus, *J. Mol. Biol.*, **151**, 35.
282. Smith R. E., Morgan M. A., Furuichi Y. (1981). Separation of the plus and minus strands of cytoplasmic polyhedrosis virus and human reovirus double-stranded genome RNAs by gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5269.
283. Smith R. E., Zweerink H. J., Joklik W. K. (1969). Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus 3, *Virology*, **39**, 791.
284. Sonenberg N., Skup D., Trachsel H., Millward S. (1981). In vitro translation in reovirus and poliovirus-infected cell extracts: effects of anti-cap binding protein monoclonal antibody, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4138.
- 284a. Spandidos D. A., Graham A. F. (1975). Complementation between temperature-sensitive and deletion mutants of reovirus, *J. Virol.*, **16**, 144.
285. Spandidos D. A., Graham A. F. (1976). Nonpermissive infection of L cells by an avian reovirus: restricted transcription of the viral genome, *J. Virol.*, **19**, 977.
286. Spandidos D. A., Graham A. F. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus, *J. Virol.*, **19**, 968.
287. Spandidos D. A., Krystal G., Graham A. F. (1976). Regulated transcription of the genomes of defective virions and temperature-sensitive mutants of reovirus, *J. Virol.*, **18**, 7.
288. Spendlove R. S., Schaffer F. L. (1965). Enzymatic enhancement of reovirus, *J. Bacteriol.*, **89**, 597.
289. Spendlove R. S., Lennette E. H., Chin J. N., Knight C. O. (1964). Effect of antimetabolic agents on intracellular reovirus antigen, *Cancer Res.*, **24**, 1826.
290. Spendlove R. S., Lennette E. H., Knight C. O., Chin J. H. (1963). Development of viral antigen and infectious virus on HeLa cells infected with reovirus, *J. Immunol.*, **90**, 548.
291. Spendlove R. S., McClain M. E., Lennette E. H. (1970). Enhancement of reovirus infectivity by extracellular removal or alteration of the virus capsid by proteolytic enzymes, *J. Gen. Virol.*, **8**, 83.
292. Spriggs D. R., Fields B. N. (1982). Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of hemagglutinin antigenic variants, *Nature*, **297**, 68.
293. Spriggs D. R., Bronson R. T., Fields B. N. (1983). Hemagglutinin variants of reovirus type 3 have altered central nervous system tropism, *Science*, **220**, 505.

294. *Spriggs D. R., Kaye K., Fields B. N.* (1983). Topological analysis of the reovirus type 3 hemagglutinin, *Virology*, **127**, 220.
295. *Sprigland I., Fox J. P., Elveback L. R., Wasserman F. E., Ketter A., Brandt C. D., Kogan A.* (1968). The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families, *Am. J. Epidemiol.*, **83**, 413.
296. *Stamatos N. M., Gomatos P. J.* (1982). Binding to selected regions of reovirus mRNAs by a nonstructural reovirus protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3457.
297. *Stanley N. F.* (1961). Relationship of hepatoencephalomyelitis virus and reoviruses, *Nature*, **189**, 687.
298. *Stanley N. F.* (1967). Reoviruses, *Br. Med. Bull.*, **23**, 150.
299. *Stanley N. F.* (1974). Diagnosis of reovirus infections: comparative aspects. In: *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*, ed. by E. Kurstak and K. Kurstak, pp. 385—421, Academic Press, New York.
300. *Stanley N. F., Joske R. A.* (1975). Animal model: chronic murine hepatitis induced by reovirus type 3, *Am. J. Pathol.*, **80**, 181.
301. *Stanley N. F., Joske R. A.* (1975). Animal model: chronic biliary obstruction caused by reovirus type 3, *Am. J. Pathol.*, **80**, 185.
302. *Stanley N. F., Leak P. J.* (1963). Murine infection with reovirus type 3 and the runtting syndrome, *Nature*, **199**, 1309.
303. *Stanley N. F., Leak P. J.* (1963). The serologic epidemiology of reovirus infection with special reference to the Rottneist Island quokka, *Am. J. Hyg.*, **78**, 82.
304. *Stanley N. F., Dorman D. C., PonsFord J.* (1953). Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepato-encephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice, *Aust. J. Exp. Biol. Sci.*, **31**, 147.
305. *Stanley N. F., Leak P. J., Walters M. N., Joske R. A.* (1964). Murine infection with reovirus. II. The chronic disease following reovirus type 3 infection, *Br. J. Exp. Pathol.*, **45**, 142.
306. *Stoltzfus C. M., Banerjee A. K.* (1972). Two oligonucleotide classes of single-stranded ribopolymers in reovirus A-rich RNA, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 733.
307. *Stoltzfus C. M., Morgan M., Banerjee A. K., Shatkin A. J.* (1974). Poly(A) polymerase activity in reovirus, *J. Virol.*, **13**, 1338.
308. *Sturm R. T., Lang G. H., Mitchell W. R.* (1980). Prevalence of reovirus 1, 2 and 3 antibodies in Ontario racehorses, *Can. Vet. J.*, **21**, 206.
309. *Taber R., Alexander V., Whitford W.* (1976). Persistent reovirus infection of CHO cells resulting in virus resistance, *J. Virol.*, **17**, 513.
310. *Tardieu M., Weiner H. L.* (1982). Viral receptors on isolated murine and human ependymal cells, *Science*, **215**, 419.
311. *Tardieu M., Powers M. L., Weiner H. L.* (1983). Agedependent susceptibility to reovirus type 3 encephalitis: role of viral and host factors, *Ann. Neurol.*, **13**, 602.
312. *Tillotson J. R., Lerner A. M.* (1966). Effect of periodate oxidation on hemagglutinating and antibody-producing capacities of certain enteroviruses and reoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1143.
313. *Tillotson J. R., Lerner A. M.* (1967). Reovirus type 3 associated with fatal pneumonia, *N. Engl. J. Med.*, **276**, 1060.
314. *Tyler K. L., Byers K. B., Bronson R. D., Fields B. N.* (1982). Genetic basis for viral injury to specific neuronal populations, *Ann. Neurol.*, **12**, 104.
315. *Tyler K. L., Byers K. B., Bronson R. D., Fields B. N.* (1983). The molecular basis of viral neurotropism, *Neurology (NY)*, **33** (Suppl. 2), 86.
316. *Tyler K. L., Schoene W. C., Fields B. N.* (1984). A single viral gene determines distinct patterns of muscle injury: genetic of reovirus myositis, *Neurology (NY)*, **34** (Suppl. 1), 191.

317. *Van der Heide L.* (1977). Viral arthritis/tenosynovitis: a review, *Avian Pathol.*, **6**, 271.
318. *Van Tongeren H. A. E.* (1957). A familial infection with hepatoencephalomyelitis virus in The Neatherlands: study on some properties of the infective agent, *Arch. Virusforschung*, **7**, 429.
319. *Vasquez C., Kleinschmidt A. K.* (1968). Electron microscopy of RNA strands released from individual reovirus particles, *J. Mol. Biol.*, **34**, 137.
320. *Vasquez C., Tournier P.* (1962). The morphology of reovirus, *Virology*, **17**, 503.
321. *Vasquez C., Tournier P.* (1964). New interpretation of the virus structure, *Virology*, **24**, 128.
322. *Wachsman J. T., Levin D. H., Acs G.* (1970). Ribonucleoside triphosphate-dependent pyrophosphate exchange of reovirus cores, *J. Virol.*, **6**, 563.
323. *Walden W. E., Godefroy-Colburn T., Thach R. E.* (1981). The role of mRNA competition in regulating translation. I. Demonstration of competition in vivo, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11, 739.
324. *Wallis C., Melnick J. L., Rapp F.* (1966). Effects of pancreatin on the growth of reovirus, *J. Bacteriol.*, **92**, 200.
325. *Wallis C., Smith K. O., Melnick J. L.* (1964). Reovirus activation by heating and inactivation by cooling in $MgCl_2$ solution, *Virology*, **22**, 608.
326. *Walters M. N., Joske R. A., Leak P. J., Stanley N. F.* (1963). Murine infection with reovirus. I. Pathology of the acute phase, *Br. J. Exp. Pathol.*, **44**, 427.
327. *Walters M. N., Leak P. J., Joske R. A., Stanley N. F., Perret D. H.* (1965). Murine infection with reovirus. III. Pathology of infection with types I and II. *Br. J. Exp. Pathol.*, **46**, 200.
328. *Walters M. L., Stanley N. F., Dawkins R. L., Alpers M. P.* (1973). Immunological assessment of mice with chronic jaundice and runting induced by reovirus 3, *Br. J. Exp. Pathol.*, **54**, 329.
329. *Ward R. L., Shatkin A. J.* (1972). Association of reovirus mRNA with viral proteins: a possible mechanism for linking the genome segments, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 378.
330. *Ward R. L., Banerjee A. K., LaFiandra A., Shatkin A. J.* (1972). Reovirus-specific ribonucleic acid from polysomes of infected L cells, *J. Virol.*, **9**, 61.
331. *Watanabe Y., Graham A. F.* (1967). Structural units of reovirus ribonucleic acid and their possible functional significance, *J. Virol.*, **1**, 665.
332. *Watanabe Y., Millward S., Graham A. F.* (1968). Regulation of transcription of the reovirus genome, *J. Mol. Biol.*, **36**, 107.
333. *Watanabe Y., Prevec L., Graham A. F.* (1967). Specificity in transcription of the reovirus genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1040.
334. *Weiner H. L., Fields B. N.* (1977). Neutralization of reovirus: the gene responsible for the neutralization antigen, *J. Exp. Med.*, **146**, 1305.
- 334a. *Weiner H. L., Ault K. A., Fields B. N.* (1980). Interaction of reovirus with cell surface receptors. I. Murine and human lymphocytes have a receptor for the hemagglutinin of reovirus type 3, *J. Immunol.*, **124**, 2143.
335. *Weiner H. L., Drayna D., Averill D. R., Jr., Fields B. N.* (1977). Molecular basis of reovirus virulence: role of the S1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5744.
336. *Weiner H. L., Greene M. I., Fields B. N.* (1980). Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. I. Identification of host and viral gene products responsible for the immune response, *J. Immunol.*, **125**, 278.
337. *Weiner H. L., Powers M. L., Fields B. N.* (1980). Absolute linkage of virulence and central nervous system tropism of reoviruses to viral hemagglutinin, *J. Infect. Dis.*, **141**, 609.
338. *Weiner H. L., Ramig R. F., Mustoe T. A., Fields B. N.* (1978). Identification of the gene coding for the hemagglutinin of reovirus, *Virology*, **86**, 581.

339. White C. K., Zweering H. J. (1976). Studies on the structure of reovirus cores: selective removal of polypeptide $\lambda 2$, *Virology*, **70**, 171.
340. Wiebe M. E., Joklik W. K. (1975). The mechanism of inhibition of reovirus replication by interferon, *Virology*, **66**, 229.
341. Wilcox G. E., Compans R. W. (1982). Cell fusion induced by Nelson Bay virus, *Virology*, **123**, 312.
342. Wolf J. L., Kaufman R. S., Finberg R., Dambrauskas R., Fields B. N. (1983). Determinants of reovirus interaction with the intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine, *Gastroenterology*, **85**, 291.
343. Wolf J. L., Rubin D. H., Finberg R., Kauffman R. S., Sharpe A. H., Tier J. S., Fields B. N. (1981). Intestinal M cells: a pathway for entry of reovirus into the host, *Science*, **212**, 471.
344. Wooley R. E., Dees T. A., Cromack A. S., Gratzek J. B. (1972). Characterization of two reoviruses isolated by sucrose density gradient centrifugation from turkeys with infectious enteritis, *Am. J. Vet. Res.*, **33**, 165.
345. Yamakawa M., Furuichi Y., Nakashima K., LaFiandra A. J., Shatkin A. J. (1981). Excess synthesis of viral mRNA 5'-terminal oligonucleotides by reovirus transcriptase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6507.
346. Yamakawa M., Furuichi Y., Shatkin A. J. (1982). Reovirus transcriptase and capping enzymes are active in intact virions, *Virology*, **118**, 157.
347. Yoon J. W., Selvaggio S., Onodera T., Wheeler J., Jenson A. B. (1981). Infection of cultured human pancreatic B cells with reovirus type 3, *Diabetologia*, **20**, 462.
348. Zarbl H., Millward S. (1983). The reovirus multiplication cycle. In: *The Reoviridae*, ed. by W. K. Joklik, pp. 107—196, Plenum, New York.
349. Zarbl H., Hastings K. E. M., Millward S. (1980). Reovirus core particles synthesize capped oligonucleotides as a result of abortive transcription, *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 348.
350. Zarbl H., Skup S., Millward S. (1980). Reovirus progeny subviral particles synthesize uncapped mRNA, *J. Virol.*, **34**, 497.
351. Zweerink H. J. (1974). Multiple forms of ss \rightarrow dsRNA polymerase activity in reovirus-infected cells, *Nature*, **247**, 313.
352. Zweerink H. J., Joklik W. K. (1970). Studies on the intracellular synthesis of reovirus-specified proteins, *Virology*, **41**, 501.
353. Zweerink H. J., McDowell M. J., Joklik W. K. (1971). Essential and non-essential non-capsid reovirus proteins, *Virology*, **45**, 716.
354. Zweerink H. J., Morgan E. M., Skyler J. S. (1976). Reovirus morphogenesis: characterization of subviral particles in infected cells, *Virology*, **73**, 442.

Репликация тогавирусов

*Милтон Дж. Шлезингер*¹

Тогавирусы относятся к числу наиболее простых животных вирусов, обладающих внешней оболочкой. Их геном состоит из одной плюс-цепи РНК (т. е. геном может служить в качестве мРНК и сам по себе инфекционен), которая заключена в белковый капсид, состоящий из одинаковых молекул, упакованных в икосаэдрической конфигурации (гл. 3). Нуклеокапсид вирусной частицы заключен в липидный бислой, происходящий из мембраны клетки-хозяина. В этом бислое утоплены и выступают из него гликопротеины, кодируемые вирусным геномом. Кроме того, геном кодирует вирусный капсидный белок и небольшое число белков, участвующих в репликации вирусной РНК.

Репликация начинается с прикрепления вируса к чувствительной клетке и заканчивается почкованием нового вируса от мембраны хозяйской клетки. Между этими двумя событиями разворачиваются три основных этапа вирус-специфической биологической активности: а) репликация генома, б) синтез и созревание вирусных структурных белков и в) сборка вируса. В настоящей главе мы подробно опишем биохимические детали различных этапов репродукции вируса. Хотя литература о репликации тогавирусов довольно обширна, имеющиеся в настоящее время данные позволяют удовлетворительно объяснить только часть репликативного цикла. Эта глава не претендует на подробное описание литературных данных, и поэтому читатель найдет в последних статьях, в которых обсуждаются различные части репликативного цикла [19, 26, 52, 77, 84, 85], а также в соответствующих главах книги «Тогавирусы» [74].

Сем. *Togaviridae* включает две основные подгруппы, альфавирусы и флавивирусы. Если по составу генома и структуре

¹ *Milton J. Schlesinger*, Department of Microbiology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110.

вирионов они очень похожи, то в некоторых важных деталях репликативных циклов существенно различаются. О репликации флавивирусов мы знаем немного, а то что известно, носит противоречивый характер. Поэтому в данной главе мы не будем подробно обсуждать репликацию флавивирусов. Большая часть вирусов, классифицируемых как *Togaviridae*, размножается и в членистоногих, и в позвоночных; в прошлом их называли арбовирусами. Хотя культивирование тканей насекомых хорошо разработано, исследования репликации в них тогавирусов заметно задержались по сравнению с исследованиями в культурах клеток позвоночных. Между репликативными событиями в этих двух системах имеются значительные различия; некоторые из них мы отметим ниже.

Большая часть информации о репликации тогавирусов получена при изучении двух близкородственных альфавирусов: вируса леса Семлики (SFV) и вируса Синдбис (SIN), растущих либо в культуре клеток почки новорожденного хомячка (ВНК), либо в первичных культурах куриных эмбрионов фибробластов (ФКЭ).

Структура генома

Полностью определена первичная структура генома SIN (49S-РНК) ([84], J. H. Strauss, личное сообщение), а структура части генома, кодирующей структурные белки, опубликована как для SIN, так и для SFV [28, 63]. Именно этим данным мы обязаны тем, что имеем детальную информацию о тогавирусах. Геном содержит ~11,2 kb; его 5'-конец экпирован 7-метилгуанозином, а 3'-конец полиаденилирован. Отметим, что эти свойства характерны для большинства эукариотических мРНК. При репликации образуются дискретные виды *субгеномных* мРНК, состоящих из ~3700 нуклеотидов, последовательность которых идентична 3'-концевой трети генома (см. рис. 21.2). Эти РНК также экпированы и полиаденилированы и служат мРНК для структурных белков вируса.

Геном флавивируса (вируса Западного Нила) также содержит 7-метилгуанозиновый экп на 5'-конце, но он не полиаденилирован [13, 97]. Образование субгеномных мРНК при репликации флавивируса не доказано [100]; известно лишь, что вирус артериита лошадей образует более короткие РНК, чем геномная [92].

Начало цикла репликации — адсорбция

Большая часть тогавирусов имеет широкий круг хозяев среди позвоночных и хорошо размножается в членистоногих,

которые служат переносчиками. Несмотря на значительные усилия, определенных данных о специфических клеточных рецепторах для этих вирусов [58] пока получить не удалось. В ряде работ показано, что некоторые поверхностные белки культивируемых клеток животных могут связываться с вирусами SFV или SIN [18, 54] и что обработка клеток протеазой губительно сказывается на адсорбции [23, 38, 78]. Адсорбция вируса на клетках сильно зависит от рН и ионной силы культуральной среды (при уменьшении того и другого параметра адсорбция усиливается) [61] и от соотношения ионных зарядов на поверхности вируса и клетки; последний фактор, по-видимому, играет наиболее важную роль [88]. Рецепторы, будь то белки, олигосахариды или липиды, могут влиять на плотность заряда на клеточной поверхности. Доказательства роли ионных сил во взаимодействии между вирусом и клеткой получены при попытках «адаптировать» SIN к размножению в клетках мышинной миеломы [87]. Пассирование вируса, который до этого выращивали в фибробластах куриных эмбрионов, на мышинных клетках привело к отбору генетически стабильных вариантов с несколькими фенотипическими отличиями от родительского вируса. В частности, были изменены суммарный заряд вириона и изоэлектрическая точка двух белков вирусной оболочки. Эти различия зарядов существенны для усиления связывания вируса с мышинными клетками, а изменение поверхностного заряда клеток мыши при добавлении гепаринсульфата облегчало связывание «родительского» вируса, выращенного на фибробластах куриного эмбриона. Таким образом, изменения белков могут приводить к такому распределению плотности заряда, которое обеспечивает эффективную адсорбцию (на данных клетках).

Хотя концепция уникального тогавирусного рецептора еще не подтверждена исчерпывающими экспериментальными доказательствами, имеются четкие данные, показывающие, что тогавирусы используют для проникновения в некоторые клетки Fc-рецепторы. Для того чтобы это произошло, вирус должен связаться с каким-либо ненейтрализующим антителом [17, 62]. Не исключено, что адсорбция и проникновение через Fc-рецепторы имеют важные клинические последствия, особенно для таких тогавирусов, как вирус денге [17, 34].

Структурными компонентами вириона, необходимыми для адсорбции, являются гликопротеиновые выступы (пепломеры) на поверхности вирусной мембраны. У альфавирусов они состоят из двух основных полипептидов, называемых E1 и E2; у флавивирусов в них входит только один белок V3 [68]. Хотя для поддержания общей структуры пепломера необходимы оба белка альфавирусов, инфекционность вируса нейтрализуют антитела только к одному из них (E2) [16, 66]. Белок E1 отно-

сится к гемагглютиниnam; он придает зараженным клеткам, так же как и вирионам, способность связывать и лизировать эритроциты [105]. Антитела против детерминант Е1 блокируют гемагглютинацию, но не нейтрализуют вирус. Именно при таком связывании антител благодаря отсутствию нейтрализации происходит заражение с помощью Fc-рецептора, описанное выше.

Проникновение вируса и раздевание

Связавшись с мембраной чувствительных клеток, тогавирусы получают доступ в цитоплазму в результате эндоцитоза, который в норме происходит при поглощении комплексов рецептор—лиганд [52, 55]. В ходе этого процесса связанный вирус накапливается во впячиваниях, которые подвергаются эндоцитозу с образованием эндосом. Содержимое эндосом закисляется [90], благодаря чему создаются условия, запускающие слияние вирусной мембраны с мембраной эндосомы (рис. 21.1). Как полагают, слияние происходит из-за конформационных изменений гликопротеинов вируса, индуцируемых низким рН

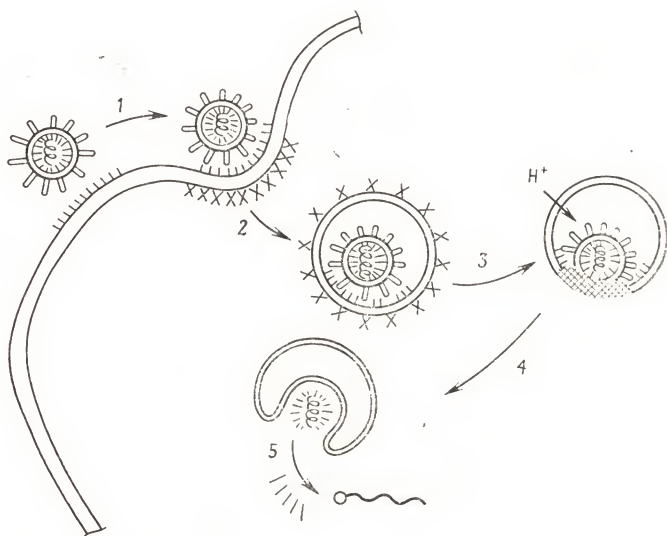


Рис. 21.1. Путь проникновения тогавирусов в клетки при адсорбционном эндоцитозе. После прикрепления к клеточной поверхности вирионы локализуются во впячиваниях клеточной мембраны (1), где они подвергаются эндоцитозу с образованием эндосом (эндоцитозных везикул) (2). При последующем изменении рН начинается слияние вирусной и эндосомной мембран (3), которое приводит к освобождению нуклеокапсида в цитоплазму (4) и раздеванию геномной РНК (5).

внутри эндосомы [20]. Механизм этого «адсорбционного эндоцитоза» при проникновении альфавирусов в клетки культуры подтверждают многочисленные факты. К ним относятся: а) неспособность связанного SFV вызывать зависящее от компонента разрушение клеток, определяемое антителами (что указывает на быстрое исчезновение гликопротеинов вируса с поверхности клетки [22]); б) способность «лизосомотропных» аминов, которые поднимают pH в эндоцитозных везикулах, подавлять инициацию репликации вируса; это свидетельствует о том, что закисление везикул необходимо на ранних этапах репликации вируса; в) необходимость низких pH (от 5 до 6) для слияния, индуцируемого гликопротеинами SIN и SFV [91, 101, 102]; д) обнаружение вируса в эндоцитозных везикулах сразу после ухода с клеточной поверхности (что видно на микрофотографиях процесса вхождения вируса в клетку [103]). Возможны и альтернативные пути, например в клетках членистоногих, где закисленные везикулы, видимо, не играют роли в инфекционном процессе. Путь, определяемый рецепторами для Fc, включает механизм типа фагоцитоза и, по-видимому, в чем-то отличается от пути с участием эндоцитоза и рецепторов. Кроме того, при определенных условиях (низкий pH при высокой множественности заражения [22]) альфавирусы могут проникать в цитоплазму путем прямого слияния с плазматической мембраной, т. е. существуют клетки, для которых механизм эндоцитоза не является основным.

Репликация вирусного генома

Перенос генома из вирионов, находящихся в эндоцитозных везикулах, в цитоплазму открывает путь для дальнейших этапов вирусной репродукции, включающих трансляцию, репликацию и транскрипцию геномной РНК. Эти ранние биохимические события еще плохо изучены, и в настоящее время многое остается на уровне догадок. Имеются, однако, сведения о структуре РНК SIN и SFV, опираясь на которые, можно попытаться выдвинуть правдоподобную схему этих процессов. Вирионные РНК транслируются *in vitro*, и поэтому есть предварительная информация о некоторых белковых продуктах. Обычно считают, что структура нуклеокапсида альфа- и флавивирусов достаточно гибкая, чтобы обеспечить диссоциацию комплекса РНК—капсидные белки при вхождении РНК в цитоплазму после слияния оболочки эндосомы с оболочкой вириона. В случае SFV при низких значениях pH нуклеокапсид сжимается в диаметре примерно на 15 %, что может обеспечить раздевание РНК. Полагают, что для раздевания протеазная активность несущей-

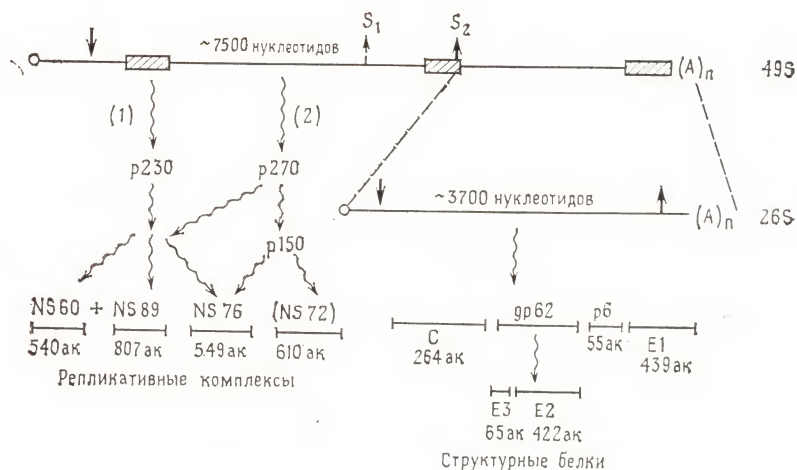


Рис. 21.2. Организация и экспрессия генома альфавируса Синдбис (SIN). Обозначения: светлый кружок — 5'-концевой 7-метилгуаниновый кэп; (A)_n — 3'-концевой poly(A); прямые стрелки, направленные вниз — участки инициации белкового синтеза; прямые стрелки, направленные вверх, сплошные или штриховые — участки терминирования; волнистые стрелки — пути процессинга полипротеина; заштрихованные прямоугольники — нуклеотидные последовательности, строго консервативные у альфавирусов; NS — неструктурный белок; C — капсидный белок; gr62 — предшественник гликопротеина; p6 — гидрофобная сигнальная последовательность E1; E1, E2, E3 — гликопротеины пепломера; ак — аминокислота. Цифры обозначают число аминокислот в зрелом белке (по данным о последовательности нуклеотидов). Число аминокислот для белков NS пока не подтверждено аминокислотным секвенированием. (Из ссылок [14, 84] и личное сообщение J. H. Strauss.)

ственна, хотя стоит отметить тот факт, что ее можно обнаружить после обработки SIN дезоксирибозой. Предварительные результаты свидетельствуют о том, что протеазная активность связана с вирионным белком (M. Schlesinger, неопубликованные данные).

Освободившись от капсидного матрикса, вирионная РНК функционирует как обычная клеточная мРНК. Наиболее вероятное место инициации трансляции — кодон AUG, расположенный на расстоянии 59 нуклеотидов от 5'-концевого 7-метилгуанинового кэпа (рис. 21.2). Получены достоверные данные о том, что этот участок является *единственным* местом связывания рибосомы с *интактной* вирионной мРНК SIN и SFV [8, 12, 32]. Трансляция происходит непрерывно на расстоянии примерно 2/3 длины РНК с образованием четырех неструктурных полипептидов [84]. В этой области РНК встречаются два стоп-

кодона (рис. 21.2) [84a]. При завершении трансляции в участке S1 образуется белок с мол. массой 230 000, который подвергается протеолитическому процессингу по двум внутренним участкам (оба содержат последовательности глицин-аланин-аланин, причем расщепление происходит между аланинами) с образованием NS60 (540 аминокислот), NS89 (807 аминокислот) и NS76 (549 аминокислот) — по порядку, начиная с N-конца 230K-предшественника [14, 24]. В случае пропуска терминирующего кодона S1 трансляция продолжается до кодона S2 и образуется 270K-предшественник, который дает три полипептидных продукта, упомянутых выше, плюс четвертый белок, NS72 (~610 аминокислот). Терминирующий кодон S2 расположен сразу за 5'-концом субгеномной 26S-РНК. На расстоянии 6 и 24 нуклеотида после S2 находятся два дополнительных терминирующих сигнала, гарантирующие прекращение трансляции далее в зону структурных белков. Формирование NS72, возможно, осуществляется через промежуточный предшественник 150K. Образование NS72 определяется супрессией терминирующего участка S1; поэтому уровень данного белка отличается от уровня других продуктов генов неструктурных белков. К тому же образование NS72 не скоординировано по времени с образованием других компонентов репликационного комплекса, и его появление может быть важным регуляторным сигналом для синтеза РНК.

Трансляция *in vitro* 49S-плюс-РНК SIN приводит к образованию трех стабильных белков (NS60, NS89 и NS76), а также короткоживущих предполагаемых предшественников с мол. массами 145, 155, 205 и 250K [14]. Белки с мол. массами 76K и 89K также обнаруживаются в виде неструктурных белков в клетках, зараженных SIN [14]. У SFV сходный набор полипептидов обнаружен как *in vivo*, так и *in vitro*, но их молекулярные массы оказались несколько иными [45]. Порядок этих полипептидов, начиная с 5'-конца цепи, таков: NS70-NS86-NS60-NS72, а предшественники обозначаются как p270, p220, p115 и p135 [48, 51].

Стабильные полипептиды, кодируемые вирусом, катализируют репликацию и транскрипцию, которые, вероятно, происходят на мембранах хозяйской клетки [15]. Можно представить себе следующую последовательность событий. На 3'-полиаденированном участке вирионной РНК начинается синтез РНК. Последовательность 19 нуклеотидов, прилегающих к участку poly(A), высококонсервативна у нескольких альфавирусов, и полагают, что она важна для связывания комплекса инициации [59]. Предполагают также, что другой домен 49S-плюс-РНК, состоящий из консервативного района длиной в 51 нуклеотид около 5'-конца (рис. 21.2), также играет роль в инициа-



Рис. 21.3. Альтернативные пути транскрипции и репликации РНК. Плюс-цепь геномной 49S-РНК связывается с полисомами, в результате чего синтезируются неструктурные белки (1). Последние способствуют синтезу минус-цепи 49S-РНК (2), которая может транскрибироваться с образованием плюс-цепей либо 49S-РНК (3), либо 26S-РНК (5). Новая дочерняя плюс-цепь 49S-РНК может связываться с капсидом (4) или войти в состав полисом (4''); она может также служить матрицей для синтеза минус-цепей 49S-РНК (4'). Единственной функцией 26S-РНК является кодирование синтеза структурных вирусных белков (6). При взаимодействии капсида с 49S-РНК образуется нуклеокапсид (7).

ции, поскольку 26S-плюс-РНК, не служащая матрицей для синтеза минус-РНК, имеет ту же последовательность, что и 3'-конец вирусной 49S-РНК [60]. Полимеризация при помощи РНК-зависимой РНК-полимеразы дает полноразмерную минус-цепь РНК (рис. 21.3, реакция 2), которая затем служит матрицей для синтеза двух транскриптов. После инициации на 3'-конце минус-цепи РНК в результате последующей полимеризации образуются новые полноразмерные 49S-плюс-РНК. Инициация на внутренней консервативной последовательности длиной в 21 нуклеотид, называемой связующим участком (рис. 21.2), и последующая реакция полимеризации приводят к образованию субгеномной 26S-мРНК (рис. 21.3, реакция 5). При добавлении GTP к 5'-концам и метилировании этого трифосфата плюс-цепи 49S- и 26S-РНК эпируются. Таким образом, для репликации и транскрипции РНК кроме двух последних активностей (кэпирования и метилирования) требуются три «инициационных» и одна «элонгационная» активность. В дополнение к этому требуется протеаза для процессинга вирусного полипротеина и образования неструктурных белков. Для того чтобы катализировать эти реакции, имеются только четыре кодируе-

мых вирусом белка. Однако не исключено, что некоторые идентифицированные белки имеют более чем одну каталитическую активность, например инициация может осуществляться полимеразой. В настоящее время нет достаточной информации, для того чтобы приписать эти активности определенным неструктурным белкам (см. ниже). Известно лишь, что у вируса западного энцефаломиелита лошадей одна ферментативная функция (нуклеотидгидролазная) связана с неструктурным белком [40].

Скорее всего в репликационно-транскрипционном процессе принимают участие белки хозяйской клетки. В клетках позвоночных тогавирусы могут реплицироваться в отсутствие активности ядра, что доказывается отсутствием подавления репликации в безъядерных клетках или размножением в клетках, обработанных актиномицином D. Однако в репликации могут принимать участие предсуществующие клеточные белки и мРНК. Продолжительное подавление синтеза РНК клетки ведет к подавлению репликации SIN [2]. В клетках членистоногих для репликации SIN нужна активность ядра [21, 72]. Кроме того, существуют интересные данные о том, что в некоторых дефектных интерферирующих частицах SIN РНК содержат на 5'-конце последовательность, частично сходную с клеточной тРНК^{Asp} [56]. Выдвинуто предположение, что такая тРНК — возможно, в сочетании с аминоксил-тРНК-синтетазой или белковым фактором элонгации — служит в качестве затравки для синтеза РНК. Поскольку в обычной вирусной РНК тРНК не обнаруживается, вероятно, она удаляется при полимеризации, возможно, под действием упомянутой выше нуклеотидгидролазы.

После первичной трансляции 49S-РНК и последующего образования матрицы минус-РНК появляется ряд «конкурирующих» активностей, схематически проиллюстрированный на рис. 21.3. Минус-РНК может быть транскрибирована либо с 3'-конца с образованием 49S-плюс-РНК, либо на внутреннем участке с образованием субгеномной 26S-плюс-РНК. Когда количество иницирующих комплексов лимитировано, связующий участок для синтеза 26S-РНК эффективно конкурирует с участком для инициации 49S-РНК и ограничивает доступ к нему. 49S-плюс-РНК может: связаться с рибосомами и транслироваться с образованием дополнительных количеств неструктурных белков (реакция 4'' на рис. 21.3), связаться с репликативным комплексом и транскрибироваться с образованием новых минус-цепей матрицы (реакция 4' на рис. 21.3) или же связаться с капсидными белками для упаковки в нуклеокапсид, когда появится достаточное количество структурных белков (реакция 4 на рис. 21.3). Каким образом регулируется ее функционирование — неизвестно, но скорее всего в этой регуляции важную роль играют капсидные белки.

Существует временная регуляция синтеза различных вирусных РНК. Синтез как плюс-, так и минус-цепей РНК увеличивается в течение первых 3—3,5 ч после заражения. Затем синтез минус-цепей останавливается, тогда как синтез 49S- и 26S-плюс-РНК продолжается с относительно постоянной скоростью. В течение всего цикла размножения 26S-РНК присутствует в трехкратном молярном избытке по сравнению с 49S-РНК, но, поскольку большая часть последней находится в нуклеокапсидах, соотношение 26S- и 49S-РНК в полисомах равно примерно 10 : 1. Не удивительно, что практически все обнаруживаемые в клетке вирус-специфические белки относятся к структурным белкам, синтезирующимся на матрице 26S-РНК. Кроме этого неструктурные белки, кодируемые 49S-РНК, в основном синтезируются в начале инфекционного цикла, когда синтез белков клетки еще не подавлен и поэтому их довольно трудно обнаружить и выделить.

Чтобы изучить процесс репликации альфавирусной РНК, проведены многочисленные исследования с использованием температурочувствительных мутантов по синтезу вирусных РНК. На основе данных генетического комплементационного анализа и исследования различных видов РНК, выделенных из клеток, зараженных этими мутантами, постулировано наличие четырех различных функций [84, 85]. Комплементационные группы А и G связываются с синтезом плюс-цепей 49S- и 26S-РНК. Однако мутанты группы А также дефектны по нормальному отключению синтеза минус-цепей 49S-РНК [70], и, кроме того, в них накапливается неструктурный полипротеин с мол. массой ~200K [10]. Мутанты комплементационных групп В и F прекращают образование минус-цепей 49S-РНК при переносе в условия с непермиссивной температурой. У мутантов группы F синтез плюс-цепей 49S- и 26S-РНК также останавливается; предполагают, что белок, дефектный у этих мутантов, имеет полимеразную активность (участвующую в элонгации). Функция, дефектная у мутантов группы В, связана с синтезом минус-, но не плюс-цепей РНК, и соответствующий генный продукт лабилен [69].

Предприняты попытки соотнести конкретные полипептиды и функции отдельных комплементационных групп, например ген G с белком NS60, ген А с белком NS89 [24], ген F с белком NS76 (предполагаемая полимераз), ген В с белком NS72. Однако до тех пор пока не будут очищены индивидуальные белки, а к ним приготовлены антитела и разработаны соответствующие системы для исследования различных активностей *in vitro*, трудно различать собственно специфическую активность белка и регулирующую активность.

Синтез структурных белков вируса: трансляция субгеномной РНК

Новообразованные структурные белки обнаруживаются в цикле репликации альфавирусов довольно рано (через 2 ч). Эти полипептиды появляются в результате нескольких протеолитических расщеплений полипротеина, протекающих в основном по мере трансляции субгеномной 26S-мРНК. Гены, кодирующие основные структурные белки, расположены в направлении 5'→3' в следующем порядке: ген капсидного белка, ген белка р62 (Е2), ген белка Е1. При их последовательной экспрессии сначала происходит транскрипция, инициированная на внутреннем участке минус-цепи 49S-РНК, с образованием кэпированной и метилированной 26S-мРНК, а затем связывание с рибосомами при помощи кодона AUG, находящегося на расстоянии ~50 нуклеотидов от кэпа (рис. 21.2). Этот кодон является единственным участком на 26S-РНК, где происходит эффективная инициация трансляции; в интактной 49S-плюс-мРНК он не функционирует. Трансляция происходит непрерывно на протяжении ~3000 нуклеотидов до участка терминации, находящегося на расстоянии 264 нуклеотида (для SIN) или 322 нуклеотида (для SFV) от 3'-концевой последовательности poly(A). Однако интактный полипротеин с мол. массой ~130 000, кодируемый этой открытой рамкой, образуется только при заражении клеток *ts*-мутантом по комплементационной группе С. В обычных условиях этот полипротеин расщепляется до завершения синтеза [7, 104] (рис. 21.4).

Первое котрансляционное расщепление происходит по связи триптофан—серин у 265-го аминокислотного остатка для SIN (269-го для SFV), в результате чего из полисомы освобождается капсидный белок. Существуют данные о том, что эта связь расщепляется автокаталитически протеазой, кодируемой геном капсидного белка [1]. В центральном участке капсидного полипептида обнаружена аминокислотная последовательность Gly-Asp-Ser-Gly, которая имеется у некоторых сериновых протеаз и, возможно, обеспечивает химотрипсиноподобную активность, постулируемую для этого белка. На рибосомах были обнаружены новосинтезированные капсидные полипептиды [31, 81], которые быстро взаимодействовали с плюс-49S-РНК с образованием нуклеокапсида [43]. Пул свободных капсидных белков мал, если он вообще существует.

По мере продолжения трансляции за участок расщепления протеазой образуется гидрофобная «сигнальная последовательность», которая, возможно, взаимодействует с небольшим клеточным рибонуклеопротеиновым комплексом. Предполагают, что при этом облегчается связывание некоторых клеточных

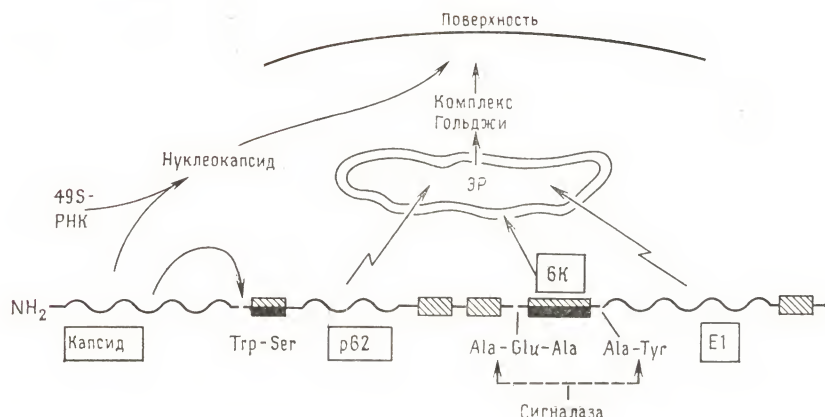


Рис. 21.4. Протеолитический процессинг альфавирусных структурных белков при трансляции связанной с мембранами 26S-мРНК. Капсидный белок отделяется в результате аутопротеолиза и образует нуклеокапсид; впоследствии нуклеокапсид соединяется на клеточной поверхности с гликопротеинами, которые были встроены в мембрану ЭР и транспортированы через аппарат Гольджи к клеточной поверхности. Наполовину темный, наполовину заштрихованный прямоугольник — гидрофобная последовательность.

мРНК с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР) и иницируется трансмембранный переход полипептидов в просвет ЭР [93, 94]. На этой стадии трансляции в просвет ЭР переходит белок р62 (E1+E2) [7]. Интересно, что сигнальная последовательность р62 не отщепляется сигнальной пептидазой клетки (сигналазой), связанной с этим комплексом. Аминоконцевая последовательность р62 оказывается в просвете ЭР, где олигосахариды, связанные с долихолом, переносятся на аспарагиновый остаток в положении 14. Аминоконцевой серин р62 ацетируется на какой-то стадии биосинтеза [4]. В ходе продолжающейся трансляции р62 выталкивается в просвет до тех пор, пока не синтезируется серия сильно гидрофобных последовательностей (рис. 21.4). У р62 SIN первая такая последовательность начинается с аминокислоты 437 и продолжается на 26 остатков; она служит в качестве трансмембранного домена, закоривающего белок в мембране [25, 65]. Предполагают, что вторая гидрофобная последовательность из 22 аминокислот образует часть цитоплазматического «хвоста», который находится на карбоксильном конце р62 и взаимодействует с нуклеокапсидом [25, 27]. Белок р62 отделяется от растущей полипептидной цепи протеазой, расщепляющей связь аланин—глутаминовая кислота (аланин—аланин для SFV). В процессе

продолжающейся трансляции 26S-мРНК, связанной с мембраной, образуется третья сильно гидрофобная последовательность, состоящая из 55—60 аминокислот (6К-белок [96] на рис. 21.4) и, как полагают, служащая сигналом для прикрепления гликопротеина Е1 к мембране ЭР [36]. Эта последовательность отщепляется от Е1 по связи аланин—тирозин. Два протеолитических расщепления, требующихся для образования белка 6К, возможно, осуществляются сигналами, связанными с нуклеопротеиновым сигнальным комплексом клетки. В результате последнего котрансляционного протеолитического расщепления белок Е1 векторно переносится в просвет ЭР. Перенос останавливается на гидрофобной последовательности длиной 23—32 остатка, прилегающей к последовательности аргинин—аргинин, которая является карбоксильным концом Е1, остающимся на цитоплазматической поверхности мембраны ЭР. Как и в случае р62, олигосахариды присоединяются к Е1 в ходе белкового синтеза в просвете ЭР [76].

Вскоре после завершения синтеза Е1 новообразованные гликозилированные трансмембранные р62 и Е1 взаимодействуют с образованием гетеродимера и вместе движутся к плазматической мембране клетки [35, 42, 106].

Созревание и транспорт вирусных гликопротеинов

После синтеза и до того момента, когда вирусные гликопротеины начинают собираться в вирионы, происходит ряд модификаций. Во-первых, модифицируются олигосахаридные цепи, причем их модификация зависит от клетки-хозяина [46]. В белке р62 присутствуют три олигосахаридные цепи, а в белке Е1 SIN две (в белке Е1 SFV только одна олигосахаридная цепь). Эти модификации включают отщепление остатков глюкозы и маннозы и добавление галактозы, N-ацетилглюкозамина, фукозы и сиаловых кислот [47] (рис. 21.5). Вероятно, они влияют на конформацию гликопротеинов и играют важную роль на начальных стадиях сворачивания белка. И хотя эти изменения могут облегчать транспорт через органеллы, они не необходимы для этого процесса [30]. Во-вторых, происходит протеолитическое расщепление гликопротеина р62 с образованием Е3 и Е2. Оно осуществляется трипсиноподобной активностью, расщепляющей по связи аргинин—серин. В SFV домен Е3 остается связанным с гликопротеиновым комплексом, тогда как в SIN он теряется [37]. В-третьих, описаны два типа ацилирования этих белков. Один состоит в ацилировании N-концевой аминокислоты р62 [3]; второй включает присоединение остатков длинноцепочечных жирных кислот [75], вероятно, в количестве от одного до двух на Е1 и от трех до шести на

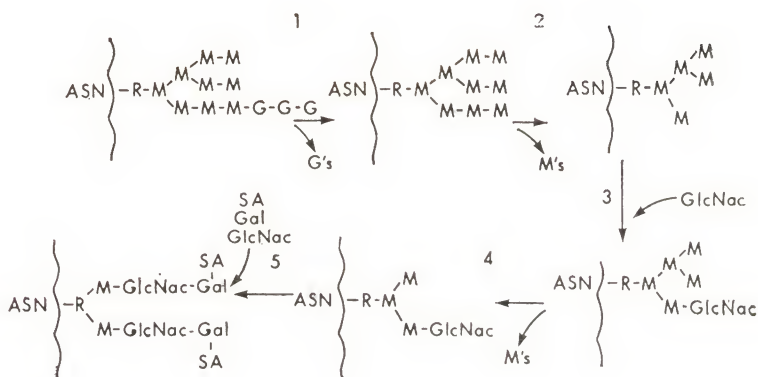


Рис. 21.5. Основной путь процессинга олигосахаридов, связанных с аспарагином. Этап 1 происходит в ЭР, этапы со 2-го по 4-й происходят в цис-Гольджи, этап 5 — в транс-Гольджи. R—GlcNac $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNac; M — манноза; G — глюкоза; GlcNac—N-ацетилглюкозамин; SA — сиаловая кислота; Gal — галактоза.

p62—E2. Длинноцепочечные жирные кислоты связываются с белками по их С-концевым доменам [65], но конкретные аминокислоты, этерифицированные остатками жирных кислот, неизвестны. Большая часть жирных кислот на p62 и E2 быстро гидролизуетсa гидроксиламином при нейтральном pH. Их нет в укороченном белке, образующемся при протеолитическом гидролизе цитоплазматических участков. Эти результаты позволяют предположить, что тиоэфиры с жирными кислотами образуются при участии цистеиниловых остатков, входящих в состав цитоплазматического домена p62 [54a].

Все эти модификации происходят по мере того, как белки движутся от мембраны ЭР через аппарат Гольджи к плазматической мембране клетки [33, 67, 89]. Олигосахаридные модификации происходят в ЭР и аппарате Гольджи. Ацилирование жирными кислотами идет, вероятно всего, в ЭР, а протеолитическое превращение p62 в E2 и E3 — в пузырьках Гольджи [6] и, возможно, также в плазматической мембране. Модификации катализируются клеточными ферментами; аналогичные посттрансляционные изменения претерпевают невирусные клеточные гликопротеины и секретируемые белки. Как указывалось выше, олигосахариды влияют на конформацию белка. Не исключено, что ацилирование жирными кислотами повышает стабильность белка в мембране и существенно влияет на образование участков взаимодействия между гликопротеинами и нуклеокапсидом или на расположение соответствующих липидов вокруг этих белков [73]. Протеолитическое превраще-

ние р62 в Е2 существенно для освобождения вируса из клетки [9, 42]. По-видимому, ни одна из этих модификаций сама по себе не является сигналом для сортировки и транспорта молекул между мембранами. Не является сигналом для сортировки и транспорта в плазматическую мембрану и 33-аминокислотный цитоплазматический домен р62/Е2. Используя технику рекомбинантных ДНК, путем deletирования последовательностей из кДНК-копии гена, кодирующего гликопротеин Е2 SFV, удалось создать четыре различных ее варианта [27a]. Когда deletированные кДНК вводили в клетки ВНК, они транскрибировались и транслировались с образованием белков, у которых были изменения в аминокислотных последовательностях на карбоксильном конце. В четырех синтезированных вариантах сохранялись старые последовательности (длиной от 3 до 15 остатков в разных вариантах) и появлялись новые (длиной от 9 до 21 аминокислоты). Несмотря на довольно сильные изменения в первичной структуре, все четыре варианта белков были обнаружены на плазматической мембране клеток, а время, требуемое для достижения ими плазматической мембраны, существенно не менялось.

Для большинства культивируемых клеток наблюдается 25-минутный лаг-период между окончанием синтеза гликопротеина и его появлением на поверхности клетки. По-видимому, примерно половину этого времени белок находится в каких-то областях ЭР — олигосахариды остаются в высокоманнозном состоянии, и белки не ацилируются жирными кислотами [75]. Однако после транспорта в аппарат Гольджи белки быстро перемещаются на клеточную поверхность, где они взаимодействуют с нуклеокапсидом.

Сборка и почкование вируса

На конечных этапах репликации тогавирусов в результате воссоединения трех структурных элементов — нуклеокапсида, липидного бислоя и гликопротеиновых пепломеров (рис. 21.4) — образуется вирион. У альфавирусов, реплицирующихся в клетках позвоночных, процесс сборки происходит в основном на плазматической мембране зараженных клеток [71, 77, 79]. Как описывалось выше, гликопротеины попадают в мембрану по тому же пути, который клетка обычно использует для транспорта поверхностных рецепторов и (или) секретируемых белков. Нуклеокапсиды образуются в цитоплазме при связывании плюс-цепи 49S-РНК с новообразованными капсидными полипептидами [99]. Известна лишь одна посттрансляционная модификация, затрагивающая капсидный белок: ацетилирование

N-концевой аминокислоты [3]. Местом связывания с нуклеиновой кислотой может служить аминоконцевой домен капсидного белка, богатый лизином, аргинином и пролином [5]. Обнаружен предполагаемый рибонуклеопротеиновый предшественник с коэффициентом седиментации 90S, однако изометрическая структура образуется только в присутствии генома [99]. Другие детали образования нуклеокапсидов в настоящее время неизвестны. Предполагают, что белок нуклеокапсидов имеет на карбоксильном конце домен, который связывается с цитоплазматическими доменами мембранного гликопротеина E2. Вероятно, это взаимодействие типа рецептор—лиганд запускает конечный процесс почкования. Считают, что к этому моменту гликопротеины собираются в микроскопления на поверхности клетки или даже (заранее) на внутренних везикулах, направляющихся к поверхности. Образование E2 и E3 из р62, возможно, стимулирует этот процесс. При переходе р62 в E2 происходит значительное изменение конформации, и взаимодействие с E1 усиливается [64]. Нуклеокапсиды узнают эти скопления и связываются с ними. Присоединение дополнительных гликопротеинов к соответствующим участкам на нуклеокапсиде составляет механизм обволакивания мембраны вокруг сферических нуклеопротеиновых частиц. Достраивание мембраны до целиком обволакивающей нуклеокапсид приводит к освобождению вириона. В целом липидные составы мембран вируса и клетки очень сходны [39]; вместе с тем имеются указания на то, что вирусный гликопротеин в некоторой степени влияет на состав мембраны [53].

В клетках ВНК и СЕФ почти все гликопротеины, обнаруживаемые на поверхности клетки, иммобилизованы в скоплениях в местах почкования вируса, т. е. свободных гликопротеинов почти нет [41]. Это послужило основой для гипотезы о том, что на конечных этапах движения гликопротеинов к поверхности клетки нуклеокапсид связывается с ними на внутренних везикулах, где происходит внутреннее почкование. У флавивирусов внутренние везикулы, видимо, служат основным местом сборки и почкования [49]; интактные, покрытые мембраной вирусы секретируются затем из этих внутренних органелл. Но механизм почкования флавивирусов в некоторой степени отличается от рассмотренного выше, поскольку, как предполагают, один из структурных белков флавивирусов V1 образует внутренний матрикс, выстилающий липидный бислой. Сборка тогавирусов в клетках членистоногих также несколько отличается от таковой в клетках позвоночных. В зараженных тогавирусами клетках членистоногих наблюдается некоторая везикулярная компартментализация областей, где происходит репликация вируса. В этих клетках не наблюдается поверхностного

почкования; полагают, что обволакивание вириона внешней оболочкой происходит в вакуолях, которые затем секретируются из клетки.

Репликация флавивирусов

По сравнению с большим объемом детальной биохимической информации об альфавирусах наши знания о других группах тогавирусов скудны. Это приходится признать с большим сожалением, поскольку флавивирусы — гораздо более опасные патогены, чем альфавирусы. Последнее обстоятельство сыграло свою роль в сдерживании серьезных исследований этих вирусов. Кроме того, большинство флавивирусов растет в культуре ткани намного медленнее, чем альфавирусы, и дает намного меньше вирионов. Поэтому трудно получить достаточные количества вирионной РНК и белков для проведения опытов, аналогичных описанным для SIN и SFV. Однако ясно, что в клетках, зараженных флавивирусами, субгеномные мРНК не накапливаются, и само их существование находится под вопросом [97]. Результаты исследования вирус-специфического белкового синтеза *in vivo* и *in vitro* привели к предположению, что у флавивирусов может быть лишь одна мРНК, имеющая несколько точек инициации трансляции [100]. Эта схема является принципиально новой для экспрессии генов эукариотической клетки, но чтобы доказать ее, необходимы более точные сведения. В опытах *in vitro* обнаруживается белок — предшественник основных структурных белков V2 и V3, и только V2 оказывается меченным по аминоконцу N-формилметонином [86, 98]. В дополнение к трем известным структурным белкам идентифицировано несколько полипептидов в качестве неструктурных вирус-специфических белков. Процессинг полипротеиновых предшественников, по-видимому, не является основным путем созревания флавивирусных белков.

Взаимодействие вируса с клеткой хозяина

Заражение пермиссивных клеток позвоночных альфавирусами быстро приводит к образованию дочернего вируса. Латентный период, когда не обнаруживается никакого инфекционного материала, продолжается примерно 2—3 ч, а максимальный выход вируса (от 100 до 1000 БОЕ/клетка) наблюдается между 5 и 8 ч после заражения. В клетках членистоногих латентный период дольше (~5—6 ч), а выход достигает максимума через 14—24 ч после заражения [83]. Флавивирусы в клетках позвоночных имеют значительно более длинный латентный период (~12 ч), а максимальные выходы вируса, значительно

меньшие, чем у альфавирусов, достигаются через 24—30 ч после заражения. Молекулярная основа этих различий между типами клеток и вирусов неизвестна.

Для всех клеток, за исключением клеток членистоногих, репликация тогавирусов является летальным событием. При этом в клетке почти полностью подавляется синтез макромолекул и очень быстро блокируется функционирование Na/K-ATPазы [29]. Однако известны многочисленные хорошо документированные случаи, когда устанавливается персистентная инфекция. Большинство из них характеризуется низким содержанием вируса или дефектными формами вирусного генома. Некоторые из дефектных вирусов фенотипически проявляются как температурочувствительные мутанты или мутанты по типу бляшек. Другие имеют свойства дефектных интерферирующих (ДИ) частиц [11, 95]. ДИ-частицы представляют собой обычный продукт большинства систем вирус—клетка; они содержат делеционный вариант вирусного генома, в котором сохраняются участки, необходимые для репликации нуклеиновой кислоты и ее упаковки в вирионы. У большинства ДИ-частиц нормальные последовательности генома перетасованы, но в то же время определенные области сохраняются. У SFV и SIN последние состоят из 3'-конца и последовательности около 5'-конца РНК [44, 55, 57, 82] (рис. 21.2). Наиболее интересная последовательность недавно обнаружена у двух ДИ-РНК SIN. На 5'-конце РНК этих ДИ-частиц последовательности практически идентичны tРНК^{Asp} клеток крысы [57]. Возможное значение этой структуры обсуждалось ранее в связи с репликацией РНК. В присутствии ДИ-РНК репликация нормальной вирусной РНК подавлена и репликация вируса оказывается угнетенной. При этом инфекция становится намного менее цитопатической и клетки могут выжить. Персистентная инфекция такого типа обычно оказывается временной; она заканчивается либо полным «излечением» (т. е. потерей всей вирусной генетической информации), либо самопроизвольным «кризисом» с обильной продукцией вируса и цитопатическим действием. Эти состояния имитируют некоторые вирусные заболевания (хотя в последних важную роль в подавлении размножения вируса играют иммунные защитные механизмы), а иногда, возможно указывают на существование необычных типов патогенности.

Литература

1. Alpert G., Schlesinger M. J. (1978). Evidence for an autoprotease of Sindbis virus capsid protein, *Virology*, 90, 336—369.
2. Baris R. S., Carlin L. J., Johnson R. E. (1983). Requirement for host transcription in the replication of Sindbis virus, *J. Virol.*, 45, 200—205.

3. Bell J. R., Strauss J. H. (1981). In vivo N-terminal acetylation of Sindbis virus proteins, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8006—8011.
4. Bell J. R., Rice C. M., Hunkapiller M. W., Strauss J. H. (1982). The N-terminus of PE2 in Sindbis virus-infected cells, *Virology*, **119**, 255—267.
5. Boege U., Wengler G., Wengler G., Wittman-Liebold B. (1980). Partial amino acid sequences of Sindbis and Semliki Forest virus-specific core proteins, *Virology*, **103**, 178—190.
6. Bonatti S., Cancedda R. D. (1982). Posttranslational modifications of Sindbis virus glycoproteins: Electrophoretic analysis of pulse-chase-labeled infected cells, *J. Virol.*, **42**, 64—70.
7. Bonatti S., Cancedda R., Blobel G. (1979). Membrane biogenesis, in vitro cleavage, core glycosylation and integration into microsomal membranes of Sindbis virus glycoproteins, *J. Cell. Biol.*, **80**, 219—224.
8. Bonatti S., Sonenberg N., Shatkin A. J., Cancedda R. (1980). Restricted initiation of protein synthesis on the potentially polycistronic Sindbis virus 42S RNA, *J. Biol. Chem.*, **255**, 11473—11477.
9. Bracha M., Schlesinger M. J. (1976). Inhibition of Sindbis virus replication by zinc ions, *Virology*, **72**, 272—277.
10. Bracha M., Leone A., Schlesinger M. J. (1976). Formation of a Sindbis virus nonstructural protein and its relation to 42S mRNA function, *J. Virol.*, **20**, 612—620.
11. Brinton M. A. (1982). Characterization of West Nile virus persistent infections in genetically resistant and susceptible mouse cells. I. Generation of defective nonplaquing virus particles, *Virology*, **116**, 84—98.
12. Cancedda R., Villa-Komaroff L., Lodish H. F., Schlesinger M. (1975). Initiation sites for translation of Sindbis virus 42S and 26S messenger RNAs, *Cell*, **6**, 215—222.
13. Cleaves G. R., Ryan T. E., Schlesinger R. W. (1981). Identification and characterization of type 2 Dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs, *Virology*, **111**, 73—83.
14. Collins P. K., Fuller F. J., Marcus P. I., Hightower L. E., Ball L. A. (1982). Synthesis and processing of Sindbis virus nonstructural proteins in vitro, *Virology*, **118**, 363—379.
15. Cross R. K., Gomatos P. J. (1982). Concomitant methylation and synthesis in vitro of Semliki Forest virus (SFV) ssRNAs by a fraction from infected cells, *J. Gen. Virol.*, **59**, 219—222.
16. Dalrymple J. M., Schlesinger S., Russell P. K. (1976). Antigenic characterization of two Sindbis envelope glycoproteins separated by isoelectric focussing, *Virology*, **69**, 93—103.
17. Daughday C. C., Brandt W. E., McCown J. M., Russell P. K. (1981). Evidence for two mechanisms of Dengue virus infection of adherent human monocytes: Trypsin-sensitive virus receptor and trypsin-resistant immune complex receptors, *Infect. Immun.*, **32**, 469—473.
18. Duda E., Berneosi K. (1980). Sindbis virus receptor protein of BNK cells, *Acta Virol.*, **24**, 149—152.
19. Eaton B. T. (1981). Viral interference and persistence in Sindbis virus infected *Aedes albopictus* cells, *Can. J. Microbiol.*, **27**, 563—567.
20. Edwards J., Mann E., Brown D. T. (1983). Conformational changes in Sindbis virus envelope proteins accompanying exposure to low pH, *J. Virol.*, **45**, 1090—1097.
21. Erwin C., Brown D. T. (1983). Requirement of cell nucleus for Sindbis virus replication in cultures of *Aedes albopictus* cells, *J. Virol.*, **45**, 792—799.
22. Fan D. P., Sefton B. M. (1978). The entry into host cells of Sindbis virus, vesicular stomatitis virus and Sendai virus, *Cell*, **15**, 985—992.
23. Fries E., Helenius A. (1979). Binding of Semliki Forest virus and its spike glycoproteins to cells, *Eur. J. Biochem.*, **97**, 213—220.

24. Fuller F. J., Marcus P. I. (1980). Sindbis virus gene order of translation in vivo, *Virology*, **107**, 441—451.
25. Garoff H., Soderlund H. (1978). The amphiphilic membrane glycoproteins of Semliki Forest virus are attached to the lipid bilayer by their COOH-terminal ends, *J. Mol. Biol.*, **124**, 535—549.
26. Garoff H., Kondor-Koch C., Riedel H. (1982). Structure and assembly of alphaviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **99**, 1—50.
27. Garoff H., Simons K., Dobberstein B. (1978). Assembly of the Semliki Forest virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum in vitro, *J. Mol. Biol.*, **124**, 587—600.
- 27a. Caroff H., Kondor-Koch C., Petterson R., Burke B. (1983). Expression of Semliki Forest virus proteins from cloned complementary DNA. II. The membrane-spanning glycoprotein E2 is transported to the cell surface without its normal cytoplasmic domain, *J. Cell Biol.*, **97**, 652—658.
28. Garoff H., Frischauf A.-M., Simons K., Lehrach H., Delius H. (1980). Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins, *Nature*, **288**, 325—241.
29. Garry R. F., Westbrooke K., Waite M. R. F. (1979). Differential effects of ouabain on host- and Sindbis virus-specific protein synthesis, *Virology*, **99**, 179—182.
30. Gibson R., Kornfeld S., Schlessinger S. (1980). A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 290—293.
31. Glanville N., Ulfman J. (1976). Biological activity of in vitro synthesized protein: Binding of Semliki Forest virus capsid protein to the large ribosomal subunit, *Biochem. Biophys. Commun.*, **71**, 393—399.
32. Glanville N., Ranki M., Kozser J., Kaariainen L., Smith A. E. (1976). Initiation of translation directed by 42S and 26S RNAs from Semliki Forest virus in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3059—3063.
33. Griffith G., Quinn P., Warren G. (1983). Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus, *J. Cell Biol.*, **96**, 835—850.
34. Halstead S. B., Bourke E. J. (1977). Antibody-enhanced dengue-virus infection in primary leukocytes, *Nature (Lond.)*, **265**, 739—742.
35. Hashimoto K., Simizu B. (1982). A temperature-sensitive mutant of Western equine encephalitis virus with an altered envelope protein E1 and a defect in the transport of envelope glycoproteins, *Virology*, **119**, 276—287.
36. Hashimoto K., Erdel S., Keranen S., Saraste J., Kaariainen L. (1981). Evidence for a separate signal sequence for the carboxy-terminal envelope glycoprotein E1 of Semliki Forest virus, *J. Virol.*, **38**, 34—40.
37. Helenius A., Von Bonsdorff C. H. (1976). Semliki Forest virus membrane proteins: Preparation and characterization of spike complexes soluble in detergent free medium, *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 895—899.
38. Helenius A., Kartenbeck J., Simon K., Fries E. (1980). On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells, *J. Cell Biol.*, **84**, 404—420.
39. Hirschberg C. B., Robbins P. W. (1974). The glycolipids and phospholipids of Sindbis virus and their relation to the lipids of the host cell plasma membrane, *Virology*, **61**, 602—608.
40. Ishida I., Simizu B., Koizumi S., Oya A., Yamada M. (1981). Nucleoside triphosphate phosphohydrolase produced in BHK-cells infected with WEE is probably associated with an 82 k dalton non-structural protein, *Virology*, **108**, 13—20.
41. Johnson D. C., Schlesinger M. J., Elson E. L. (1981). Fluorescence photobleaching recovery measurements reveal differences in envelopment by Sindbis and vesicular stomatitis virus, *Cell*, **23**, 423—431.
42. Jones K. J., Scupham R. K., Pfeil J. A., Wan K., Sagik B. P., Bose H. R.

- (1977). Interaction of Sindbis virus glycoproteins during morphogenesis, *J. Virol.*, **21**, 778—787.
43. Kaariainen L., Keranen S., Lachmi B., Soderlund H., Tuomi K., Ulmanen I. (1975). Replication of Semliki Forest virus, *Med. Biol.*, **53**, 342—353.
 44. Kaariainen L., Pettersson R. F., Keranen S., Lehtovaara P., Soderlund H., Ukkonen P. (1981). Multiple structurally related defective-interfering RNAs formed during undiluted passages of SFV, *Virology*, **113**, 686—697.
 45. Kalkkinen N., Laaksonen M., Soderlund H., Jornvall H. (1981). Radio-sequence analysis of in vivo multilabeled nonstructural protein NS86 of Semliki Forest virus, *Virology*, **113**, 188—195.
 46. Keegstra K., Seffon B., Burke D. (1975). Sindbis virus glycoprotein effect of the host cell on the oligosaccharides, *J. Virol.*, **16**, 613—620.
 47. Kornfeld S., Li E., Tabas I. (1978). The synthesis of complex-type oligosaccharides. II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein, *J. Biol. Chem.*, **253**, 7771—7778.
 48. Lachmi B., Kaariainen N. (1976). Sequential translation of non-structural proteins in cells infected with a Semliki Forest virus mutant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1936—1940.
 49. Leary K., Blair C. D. (1980). Sequential events in the morphogenesis of Japanese encephalitis virus, *J. Ultrastruct. Res.*, **72**, 123—129.
 50. Lehtovaara P., Soderlund H., Keranen S., Pettersson R. F., Kaariainen L. (1981). 18S defective interfering RNA of Semliki Forest virus contains a triplicated linear repeat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5353—5357.
 51. Lehtovaara P., Ulmanen I., Kaariainen L., Keranen S., Philipson L. (1980). Synthesis and processing of Semliki Forest virus-specific non-structural proteins in vivo and in vitro, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 461—468.
 52. Lenard J., Miller D. K. (1983). Entry of enveloped virus into cells. In: *Receptor-Mediated Endocytosis*, ed. by P. Cuatrecasas and T. Roth, Chapman and Hall, London.
 53. Loukkonen A., Kaariainen L., Rekonen O. (1976). Phospholipids of Semliki Forest virus grown in cultured mosquito cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 109—120.
 54. Maassen J.-A., Terhorst C. (1981). Identification of a cell surface protein involved in the binding site of Sindbis virus on human lymphoblastic cell lines using a heterobifunctional cross-linker, *Eur. J. Biochem.*, **115**, 153—158.
 - 54a. Magee A. I., Koyama A. H., Malfer C., Wen D., Schlesinger M. J. (1984). Release of fatty acids from virus glycoproteins by hydroxylamine, *Biochim. Biophys. Acta*, **798**, 156—166.
 55. Marsh M., Helenius A. (1980). Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus, *J. Mol. Biol.*, **142**, 439—454.
 56. Monroe S. S., Schlesinger S. (1983). RNAs from two independently isolated defective interfering particles of Sindbis virus contain a cellular tRNA at their 5' end, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3279—3283.
 57. Monroe S. S., Ou J.-H., Rice M. C., Schlesinger S., Strauss E. G., Strauss J. H. (1982). Sequence analysis of cDNA's derived from the RNA of Sindbis virions and of defective interfering particles, *J. Virol.*, **41**, 153—162.
 58. Oldstone M. B. A., Tichon A., Dutko F. Y., Kennedy S. I. T., Holland J. J., Lampert P. W. (1980). Does the major histocompatibility complex serve as a specific receptor for Semliki Forest virus? *J. Virol.*, **34**, 256—265.
 59. Ou J.-H., Strauss E. G., Strauss J. H. (1981). Comparative studies of the 3'-terminal sequences of several alphavirus RNAs, *Virology*, **109**, 281—289.
 60. Ou J.-H., Strauss E. G., Strauss J. H. (1983). The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses, *J. Mol. Biol.*, **168**, 1—15.
 61. Pierce J. S., Strauss E. G., Strauss J. H. (1975). Effects of ionic strength on the binding of Sindbis virus to chick cells, *J. Virol.*, **13**, 1030—1036.
 62. Princes J. S. M., Porterfield S. S. (1979). Antibody-modified enhancement in

- flavivirus replication in macrophage cell lines, *Nature*, **282**, 509—511.
63. *Rice C. M., Strauss J. H.* (1981). Nucleotide sequence of the 26S mRNA of Sindbis virus and deduced sequence of the encoded virus structural proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2062—2066.
 64. *Rice C. M., Strauss J. H.* (1982). Association of Sindbis virion glycoproteins and their precursors, *J. Mol. Biol.*, **154**, 325—348.
 65. *Rice C. N., Bell J. R., Hunkapiller M. W., Strauss E. G., Strauss J. H.* (1982). Isolation and characterization of the hydrophobic COOH-terminal domains of the Sindbis virion glycoproteins, *J. Mol. Biol.*, **154**, 355—378.
 66. *Roehrig J. T., Gorski D., Schlesinger M. J.* (1982). Properties of monoclonal antibodies directed against the glycoproteins of SV, *J. Gen. Virol.*, **59**, 421.
 67. *Rothman J. E., Fine R. E.* (1980). Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 780—784.
 68. *Russell P. K., Brandt W. E., Dalrymple J. M.* (1980). Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: *The Togaviruses*, ed. by R. W. Schlesinger, pp. 503—529, Academic Press, New York.
 69. *Sawicki D. L., Sawicki S. G., Keranen S., Kaariainen L.* (1980). Specific SV-coded function for minus-strand RNA synthesis, *J. Virol.*, **39**, 348—358.
 70. *Sawicki S. G., Sawicki D. L., Kaariainen L., Keranen S.* (1981). A Sindbis virus mutant temperature-sensitive in the regulation of minus-strand RNA synthesis, *Virology*, **115**, 161—172.
 71. *Scheefers H., Scheefers-Borchel U., Edwards J., Brown D. T.* (1980). Distribution of virus structural proteins and protein-protein interactions in plasma membrane of baby hamster kidney cells infected with Sindbis or vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7277—7281.
 72. *Scheefers-Borchel U., Scheefers H., Edwards J., Brown D. T.* (1981). SV maturation in mosquito cells is sensitive to actinomycin D, *Virology*, **110**, 292.
 73. *Schlesinger M. J., Malfer C.* (1982). Cerulenin blocks fatty acid acylation of glycoproteins and inhibits vesicular stomatitis and Sindbis virus particle formation, *J. Biol. Chem.*, **257**, 9887—9890.
 74. *Schlesinger R. W., ed.* (1980). *The Togaviruses*, Academic Press, New York.
 75. *Schmidt M. F. G., Schlesinger M. J.* (1980). Relation of fatty acid attachment to the translation and maturation of vesicular stomatitis and Sindbis virus membrane glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3334—3339.
 76. *Sefton B. M.* (1977). Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins, *Cell*, **10**, 659—668.
 77. *Simons K., Garoff H.* (1980). The budding mechanism of enveloped animal viruses, *J. Gen. Virol.*, **50**, 1—21.
 78. *Smith A. L., Tignor G. H.* (1980). Host cell receptors for two strains of Sindbis virus, *Arch. Virol.*, **66**, 11—26.
 79. *Smith J. F., Brown D. T.* (1977). Envelopment of Sindbis virus: Synthesis and organization of proteins in cells infected with wild type and maturation defective mutants, *J. Virol.*, **22**, 662—678.
 80. *Soderlund H.* (1973). Kinetics of formation of the Semliki Forest virus nucleocapsid, *Intervirology*, **1**, 354—361.
 81. *Soderlund H., Ulfman I.* (1977). Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes, *J. Virol.*, **24**, 907—909.
 82. *Soderlund H., Keranen S., Lehtovaara P., Palva I., Pettersson R. F., Kaariainen L.* (1981). Structural complexity of DI-RNAs of SFV as revealed by analysis of complementary DNA, *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3403—3417.
 83. *Stollar V.* (1980). Togaviruses in cultured arthropod cells, In: *The Togaviruses*, ed. by R. W. Schlesinger, pp. 583—621, Academic Press, New York.
 84. *Strauss E. G., Strauss J. H.* (1982). Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin.
 - 84a. *Strauss E. G., Rice C. M., Straus J. H.* (1983). Sequence coding for the al-

- phavirus nonstructural proteins is interrupted by an oral termination codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5271—5275.
85. *Strauss J. H., Strauss E. G.* (1977). Togaviruses. In: *The Molecular Biology of Animal Viruses*, ed. by D. P. Nayak, pp. 111—166, Dekker, New York.
 86. *Svitkin Y. V., Ugarova T. Y., Chernovskaya T. V., Lyapustin V. N., Lashkevich V. A., Agol V. I.* (1981). Translation of tick-borne EV genome, *in vitro* synthesis of two structural polypeptides, *Virology*, **110**, 26—34.
 87. *Symington J., Schlesinger M. J.* (1975). Isolation of a Sindbis virus variant by passage on mouse plasmacytoma cells, *J. Virol.*, **15**, 1037—1041.
 88. *Symington J., Schlesinger M. J.* (1978). Characterization of a Sindbis virus variant with altered host range, *Arch. Virol.*, **58**, 127—136.
 89. *Tabas I., Kornfeld S.* (1978). The synthesis of complex-type oligosaccharides, *J. Biol. Chem.*, **253**, 779—786.
 90. *Tycko B., Maxfield F. R.* (1982). Rapid acidification of endocytic vesicles containing α_2 -macroglobulin, *Cell*, **28**, 643—651.
 91. *Vaananen P., Kaariainen K.* (1980). Fusion and haemolysis of erythrocytes caused by three togaviruses: Semliki Forest, Sindbis and Rubella, *J. Gen. Virol.*, **46**, 467—475.
 92. *VanBerlo M. F., Horzinek M. C., Van der Zeijst B. A. M.* (1982). Equine arteritis virus infected cells contain six polyadenylated virus-specific RNAs, *Virology*, **118**, 345—352.
 93. *Walter P., Blobel G.* (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III. Signal recognition protein (SRP) causes signal-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes, *J. Cell Biol.*, **91**, 557—561.
 94. *Walter P., Blobel G.* (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocations across the ER, *Nature*, **299**, 691—698.
 95. *Weiss B., Rosenthal R., Schlessinger S.* (1980). Establishment and maintenance of persistent infection by SV in BHK cells, *J. Virol.*, **33**, 463—474.
 96. *Welch W. J., Sefton B. M.* (1980). Characterization of a small, nonstructural viral polypeptide present late during infection of BHK cells by Semliki Forest virus, *J. Virol.*, **33**, 230—237.
 97. *Wengler G., Wengler G.* (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile: Absence of poly(A) and possible role in RNA replication, *Virology*, **113**, 544—555.
 98. *Wengler G., Beato M., Wengler G.* (1979). *In vitro* translation of 42S-RNA from cells infected with flavivirus West Nile virus, *Virology*, **96**, 516—529.
 99. *Wengler G., Boege U., Wengler G., Bischoff H., Wahn K.* (1982). The core protein of the alphavirus Sindbis virus assembles into core-like nucleoproteins with the viral genome RNA and with other single-stranded nucleic acids *in vitro*, *Virology*, **118**, 401—410.
 100. *Westaway E. G.* (1980). Replication of flaviviruses. In: *The Togaviruses*, ed. by R. W. Schlesinger, pp. 531—581, Academic Press, New York.
 101. *White J., Helenius A.* (1980). pH-Dependent fusion between the Semliki Forest virus membrane and liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3273.
 102. *White J., Kartenbeck J., Helenius A.* (1980). Fusion of Semliki Forest virus with the plasma membrane can be induced by low pH, *J. Cell Biol.*, **87**, 264.
 103. *White J., Matlin K., Helenius A.* (1981). Cell fusion by Semliki Forest influenza, and vesicular stomatitis virus, *J. Cell Biol.*, **89**, 674—679.
 104. *Wirth D. F., Katz F., Small B., Lodish H. F.* (1971). How a single Sindbis virus mRNA directed the synthesis of one soluble protein and two integral membrane glycoproteins, *Cell*, **10**, 253—263.
 105. *Yamamoto K., Suzuki K., Simizu B.* (1981). Hemolytic activity of the envelope glycoproteins of Western equine encephalitis virus in reconstitution experiments, *Virology*, **109**, 454.
 106. *Zrmieski A., Garoff H., Simons K.* (1980). Formation of the Semliki Forest virus membrane gp-complexes in the infected cells, *J. Gen. Virol.*, **50**, 111—123.

Репликация аренавирусов и буньявирусов

Дэвид Бишоп¹

Сем. *Arenaviridae* — одно из самых немногочисленных среди РНК-содержащих вирусов; в него входит 14 представителей. В противоположность этому сем. *Bunyaviridae* — самое представительное и насчитывает более 200 отдельных серотипов, подтипов и вариантов вирусов [25—27, 33, 127, 190, 191, 228]. Помимо нескольких неклассифицированных вирусов в него входят четыре рода: *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* и *Uukuvirus* [33]. Однако эта классификация в будущем может измениться, поскольку недавний анализ нуклеотидных последовательностей поставил вопрос о том, достаточно ли близка стратегия репликации этих вирусов (например, буньявирусов и флебовирусов), чтобы помещать их в одно семейство. В настоящей главе, однако, мы будем рассматривать их как представителей одного семейства.

Хотя в последние годы при использовании генетических, молекулярных и клеточных подходов был достигнут значительный прогресс в понимании процессов репликации аренавирусов и буньявирусов [41, 165], в наших знаниях остаются существенные пробелы, которые предоставляют широкое поле деятельности. В этой главе после краткого описания семейств и характеристики входящих в семейства и роды вирусов будут рассмотрены процессы репликации отдельных представителей *Bunyaviridae* и *Arenaviridae*.

Семейство *Bunyaviridae*

Прототипом вирусов сем. *Bunyaviridae* является переносимый комарами вирус Буньямвера, впервые выделенный в Центральной Африке [25, 228]. Этот вирус служит также прототипом

¹ David H. L. Bishop, NERS Institute of Virology, Oxford, OX1 3SR, United Kingdom.

серогруппы, члены которой обнаруживаются в ограниченных очагах по всему миру (серогруппа Буньямвера), а также прототипом рода *Bunyavirus* [25, 33]. Как показано в табл. 22.1, род *Bunyavirus* состоит из ~16 серогрупп, включающих ~150 серотипов, подтипов и вариантов вирусов.

Известны также три других рода сем. *Bunyaviridae*: *Phlebovirus* (см. табл. 22.2), *Nairovirus* (см. табл. 22.3), и *Uukuvirus* (см. табл. 22.4). Прототипами этих родов служит соответственно вирус москитной неапольской лихорадки (SFN), вирус крымской геморрагической лихорадки (КГЛ-Конго) [33] и вирус Укунии. Кроме того, существует пять серогрупп вирусов (Бакау, Хантаан, Каисоди, Мапутта и Йогуэ), а также 11 вирусов, которые в настоящее время рассматривают как потенциальных членов семейства (см. табл. 22.5). Будут ли эти вирусы когда-либо включены в данное или другое семейство (возможно, новое), пока неясно.

Свойства вирусов, которые включены в семейство *Bunyaviridae* или рассматриваются в качестве кандидатов в члены этого семейства, таковы:

1. Вирусы размером 90—100 нм в диаметре имеют оболочку, чувствительную к растворителям липидов.
2. Вирусные частицы содержат три внутренних нуклеокапсида, каждый из которых состоит из нуклеокапсидного белка, уникальной одноцепочечной геномной РНК и фермента транскриптазы.
3. Вирусы имеют внешний гликопротеиновый слой, содержащий типоспецифические антигены.
4. Морфогенез вируса включает почкование в вакуоли и пузырьки аппарата Гольджи зараженной клетки.
5. Вирусы обладают способностью к генетическому взаимодействию с некоторыми серологически родственными вирусами; при этом образуются рекомбинантные вирусы за счет реассортации фрагментов генома.

Схема вириона буньявируса приведена на рис. 22.1. В отличие от членов трех других семейств вирусов с минус-РНК (*Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae*) члены *Bunyaviridae* не содержат внутреннего матричного белка. Эти вирусы отличаются от всех других вирусов животных местом созревания (аппарат Гольджи) и тем, что их геном содержит три сегмента РНК [41]. Аренавирусы также не содержат матричного белка, но почкуются от плазматической мембраны [160]. У поверхностных гликопротеинов вирусов этого семейства не обнаружено каких-либо ферментативных функций (например, нейраминидазной активности). Хотя многие из этих вирусов агглютинируют эритроциты, они не имеют столь выражен-

Таблица 22.1. Серологическая классификация вирусов рода *Bunyavirus*¹⁾ сем. *Bunyaviridae*

Группа Анофелес А	Группа Бвамба	Группа Капим	Группа Патоис
Анофелес А СоАг 3624 ²⁾ СоIAn 57389 ²⁾ Лас Малойас Лукуни Тромбетас ²⁾	Бвамба Понгола	Морише Беневидес БушБуш Бенфика GU71U344 ²⁾ Хуан Диас Гуаяра (GU71U350 ²⁾)	Патоис Абрас Бабахойо Шарк Ривер Зегла Пахайоки
Таканума H-32580 ²⁾ SPAg 2317 ²⁾ (Вирджин Ривер) СоАг 1071 ²⁾ (СоАг 3627 ²⁾)	Группа С Карапару Карапару (ВеН5546 ²⁾) Тринидад ²⁾ Осса Апеу Винцес Бруконха ²⁾ Мадрид Маритуба Мурутуку Рестан Непуйо (63U11 ²⁾) Гумбо-Лимбо	Группа Гамбоа Гамбоа Пуэбло Вьехо (75-2621 ²⁾) Алайуела ²⁾ Сан Хуан (78V2441 ²⁾ , 75V-2374 ²⁾)	Группа Симбу Симбу Акабане Яба-7 ²⁾ Мансанилья Ингвавума Инини Мермет Баттонвиллоу
Группа Анофелес Б	Орибока Итакуи	Группа Гуама Гуама Ананиндеуа Можу Махогани Хаммок Бертиога Кананейя Гуаратуба Итимирим Мирим Бимити Кату Тимботеуа	Нола Оропуче Фасей Пэд- док ²⁾ Утинга Утив ²⁾ Сабо Тинароо Сатупери (Дуг- лас) Шамонда Санго Питон Щунни Аино (Каика- лур, Сам- форд ²⁾) Тимири
Группа Буньямве- ра	Калифорнийская группа Калифорнийский энцефалит Инкоо Ла Кросс (ви- рус зайца- беляка) Сан Анджело Тягиня (Лум- бо ²⁾) Мелао Кейстон Джеймстаун Каньон (Саус Ри- вер ²⁾ , Джерри Слаф) Серра до На- вино Тривитатус Гуароа	Группа Кунгол Кунгол Вонгал Группа Минатит- лан Минатитлан Палестина Группа Олифант- свлей Олифантсв- лей (Бобиа) Ботамби	Группа Тете Тете Бахиг Матрух Тсурусе Батама Группа Турлок Турлок Леднице Умбре Мпоко Яба-1 ²⁾
Буньямвера Батаи (Кало- во) Бирао Долина Каш (Тлакотал- пан) Магуари (СваАг 426 ²⁾) Плайас Ксингу ²⁾ Джермистон Илеша Локерн Норсуэй Санта Роза Шокве ²⁾ Тенсо Каири Мэйн Дрэйн Вьеомиа Анхемби (ВеАг 314206 ²⁾ , ВеАг 328208 ²⁾) Макауа ²⁾ Соророка Таиассуи ²⁾	Группа Капим Капим Акара		

¹⁾ Вирусы классифицированы по трем ступеням, обозначенным уровнем сдвига строки: комплекс, вирус и подтип; вирусы, указанные в скобках, являются вариантами.

²⁾ Эти вирусы не включены в Международный каталог арбовирусов [25, 127].

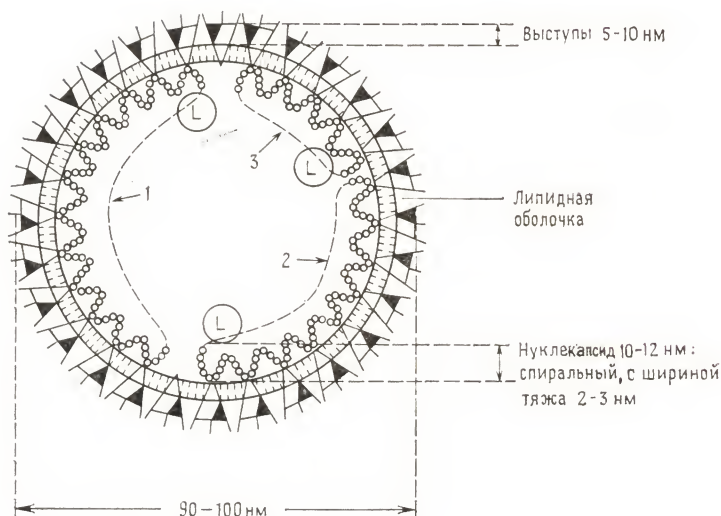


Рис. 22.1. Схематическое изображение структуры буньявируса. Нуклеокапсиды (три, внутренние, спиральные, кольцевые): 1 — L-РНК + (N+L)-белки; 2 — М-РНК + (N+L)-белки; 3 — S-РНК + (N+L)-белки; белок L — транскриптаза (?). Гликопротеины (два, G1, G2, внешние) пронизывают внешнюю мембрану (?).

ной гемагглютинирующей активности, как, например, ортомиксовирусы и некоторые парамиксовирусы [21].

При выделении и изучении передачи вирусов обнаружено, что большая часть буньявирусов передается членистоногими, преимущественно комарами [33]. Наиовирусы и укукувирусы большей частью передаются клещами [33]. Флебовирусы чаще передаются москитами и комарами, хотя некоторые флебовирусы и буньявирусы могут передаваться мокрецами *Culicoides*. Вирус Хантаан и родственные ему вирусы относятся к исключениям: их основные хозяева — грызуны [134—136, 241]. Никаких свидетельств участия членистоногих в их передаче не обнаружено.

Хотя многие члены семейства имеют ограниченное распространение, некоторые выделены более чем на одном континенте мира (вирус КГЛ-Конго выделен в Африке и Европе). Большинство буньявирусов либо не имеют никакого, либо имеют незначительное экономическое значение; некоторые из них, однако, являются возбудителями заболеваний человека (например, вирус Ла Кросс). Ряд членов семейства вызывает заболевания домашних животных. Это заставляет проводить в энзоотических районах ежегодные вакцинации животных (на-

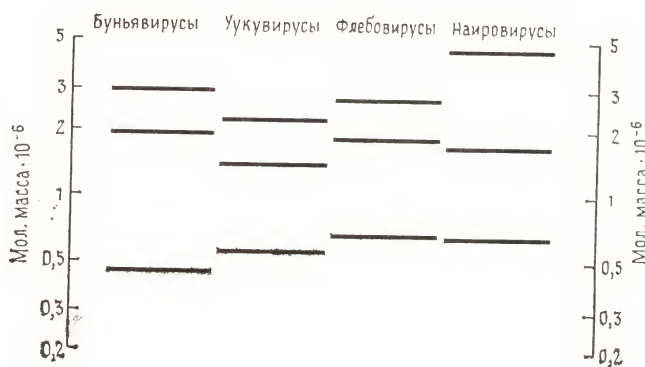


Рис. 22.2. Размеры сегментов вирусной РНК буньявирусов, уукувирусов, флебовирусов и наиравирусов.

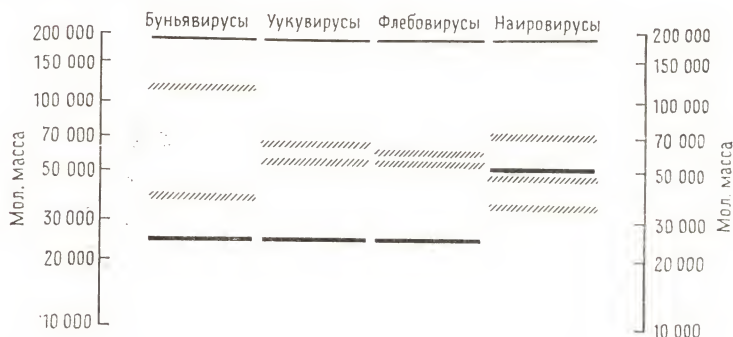


Рис. 22.3. Размеры белка нуклеокапсид (темные полосы) и гликопротеинов (полоски со штриховкой) буньявирусов, уукувирусов, флебовирусов и наиравирусов.

пример, в Южной Африке против флебовируса лихорадки Долины Рифт).

Размеры вирусных РНК и основных структурных белков буньявирусов, наиравирусов, уукувирусов и флебовирусов варьируют в пределах, указанных на рис. 22.2 и 22.3. Сегменты РНК буньявирусов, наиравирусов, флебовирусов и уукувирусов имеют строго определенную (в пределах каждого рода) 3'-концевую последовательность [73, 174].

На генетическом уровне не получено каких-либо указаний на возможность рекомбинации между представителями различных родов вирусов. Как обсуждается ниже, способность к рекомбинации в пределах рода присуща лишь близкородствен-

ным вирусам. При геномном анализе природных изолятов получены свидетельства реассортации *in vivo* [131, 243]. Однако реассортация в природных условиях относится скорее к исключениям, чем к правилам. Основными факторами эволюции буньявирусов служат, вероятно, генетический дрейф, включающий накопление точечных мутаций, и случайные делеции или дубликации.

Род *Bunyavirus*

Род *Bunyavirus* — самый представительный в сем. *Bunyaviridae* (табл. 22.1). Вирусы объединены в этот род в результате широкого анализа перекрестного связывания комплемента и распределены в нем по серогруппам на основании перекрестной нейтрализации и реакции подавления гемагглютинации [25—27, 33, 127, 228]. Результаты таких исследований указывают на то, что члены индивидуальных серогрупп (табл. 22.1) буньявирусов имеют общие эпитопы нейтрализации и гемагглютинации, тогда как у членов разных серогрупп общие эпитопы отсутствуют. Наличие общих последовательностей белка внутреннего нуклеокапсида (N) у некоторых буньявирусов (например, вирусов Айно и Ла Кросс, рис. 22.4) [3] может соответствовать некоторым из эпитопов, выявляемым при перекрестной реакции связывания комплемента, что позволяет пометить различные серогруппы в один род. За информацией о распространении, выделении, спектре хозяев, тропности и патогенности различных буньявирусов мы отсылаем читателя

	1	11	21	31	41	51	-
LAC N	MSD-LVFYDV	ASTGANGFDP	DAGYMDFCVK	NAESLNLAUV	RIFFLNAAKA	KAALSRKPER	
	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	
AINO N	MANGFIFGDV	PQRNLATFNP	EVGYVAFIAK	HGAGLNFDVT	RFFFLNGKKA	KMVLSTKQAP	
	1	11	21	31	41	51	
	61	71	81	91	101	111	
LAC N	KANPKFGEWG	VEVINNHFFG	NRNNPIGNND	LTIHRLSGYL	ARWVLDGYNE	NDDESGHLEI	
	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	
AINO N	SVDLTFGGIK	FTLVNNHFFG	YTANPVPDTA	LTILRLSGYL	AKWVADGCKT	NGIKLAEAME	
	61	71	81	91	101	111	
	121	131	141	151	161	171	
LAC N	RTTIINPIAE	SNVGVGWDSGP	EIYLSFFPGT	EMFLETKFY	PLTIGIHRVK	QGMMDPGYLK	
	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	
AINO N	K--IVMPLAE	UKGCTWTEGL	TMVLGFAPGA	EMFLETFEFY	PLVIDMHRVL	KDGMVDVFMR	
	121	131	141	151	161	171	
	181	191	201	211	221	231	
LAC N	KALRGRYGTL	TADKWMSSQKV	AAIAKSLKDV	EGLKWGKGGL	SDTAKTFLGK	FGIRLP*	
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
AINO N	KVLRGRYGT	TAEGWMTGKI	DAVRAAFNAV	GGLSWAKSGF	SPAARAFLAG	FGINI**	
	181	191	201	211	221	231	

Рис. 22.4. Сравнение аминокислотных последовательностей (в однобуквенном коде) белка нуклеокапсида вирусов Ла Кросс (LAC) и Айно (AINO) [3].

к Международному каталогу арбовирусов [25—27, 33, 127, 228] и к более раннему обзору [33]. Детали, относящиеся к серологическим взаимоотношениям буньявирусов, обсуждаются в другой главе.

Свойства вирусов рода *Bunyavirus* перечислены ниже:

1. Имеющие внешнюю оболочку, чувствительные к растворителям липидов буньявирусы часто видны в электронный микроскоп как сферические (имеющие форму пончика) частицы 90—100 нм в диаметре с плохо различимым расположением поверхностных гликопротеинов [161, 162].
2. Два вирусных гликопротеина (G1, 110—120K, и G2, 30—40K), имеющие ковалентно связанные остатки жирных кислот [149] и несколько углеводных цепей [65, 253], присутствуют в эквимольном соотношении [100, 132, 162, 208, 243, 244]. Полисахариды относятся к сложному эндо Н-резистентному типу [149]. Гликопротеины индуцируют нейтрализующие антитела и взаимодействуют с ними [103, 107, 108]. Вероятно, гликопротеины являются основными детерминантами вирулентности (клеточно-органный тропности) и эффективности передачи вирусов членистоногими [16—19, 219—221].
3. Три внутренних кольцевых нуклеокапсида находятся в рыхлой спиральной конфигурации [46, 163, 213]. Каждый содержит уникальный вид негативной вирусной РНК [47, 74], много копий белка нуклеокапсида (N, 19—26K) и несколько копий большого белка L (150—200K), предположительно являющегося компонентом транскриптазы [162, 163]. РНК, связанные с нуклеокапсидом, обозначают по размеру как большую (L, $3 \cdot 10^6$ Да), среднюю (M, $2 \cdot 10^6$ Да) и малую [S, $(0,3—0,5) \cdot 10^6$ Да]. При выделении нуклеокапсидов или вирусной РНК сегменты редко оказываются в эквимольном соотношении. Обычно преобладает сегмент S [47, 100, 163].
4. Сегмент S вирусной РНК кодирует два белка, считываемые с перекрывающихся рамок трансляции в комплементарной последовательности [2, 3, 39, 40, 57, 71, 72, 89, 90, 97]. Этими белками являются N и неструктурный белок, обозначаемый NS_S (10K).
5. Сегмент M кодирует в комплементарной последовательности как белки G1 и G2 [98], так и другой неструктурный белок (NS_M, 15—17K) [89, 90]. Белки G1 и G2 имеют уникальные последовательности [98]. Отношения между NS_M и белками G1 и G2 или NS_M и общим продуктом трансляции пока не определены.
6. Полагают, что РНК L кодирует в комплементарной последовательности белок L, который, возможно, является компонентом транскриптазы [71].

7. Все сегменты вирусной РНК имеют общую консенсусную последовательность UCAUCACAUG... 3'-конца и комплементарную ей некэпированную последовательность на 5'-конце [3, 71—73, 164, 174]. Предполагают, что нековалентно замкнутую кольцевую конфигурацию выделенной РНК [47, 214] и соответствующих вирусных нуклеокапсидов определяет взаимодействие за счет водородных связей между 3'- и 5'-концом.
8. Вирусные мРНК имеют на 5'-конце гетерогенные невирусные последовательности длиной примерно 14 нуклеотидов, которые, вероятно, заимствованы из хозяйских мРНК при инициации транскрипции [37]. Для каждого РНК-сегмента пока обнаружена только одна субгеномная мРНК. Транскрипция и репликация вирусной РНК не подавляется ни актиномицином D, ни α -аманитином [249].
9. Морфогенез вируса происходит в аппарате Гольджи зараженной клетки [161]. Процесс последующего освобождения вируса пока не изучен.
10. Обнаружена рекомбинация за счет обмена сегментами РНК между вирусами серогруппы калифорнийского энцефалита [29—36, 38, 96, 99, 101, 102, 104, 207], между вирусами серогруппы Буньямвера [123, 124, 192] и между вирусами серогруппы С [31, 36] (единственные буньявирусы, генетически изученные до настоящего времени), но не между членами разных серогрупп. Даже для близкородственных в серологическом отношении вирусов как при рекомбинации *in vitro* в культуре [102, 104], так и *in vivo* в членистоногих-переносчиках [20] наблюдаются предпочтительные комбинации генотипа (ограниченная рекомбинация).
11. Описана горизонтальная (от переносчика к хозяину, от самцов-комаров к самкам) и вертикальная (трансовариальная) передача некоторых буньявирусов в определенных членистоногих-переносчиках [23, 155, 156, 172, 231—234, 254—256]. Выделение вирусов в течение зимы и весны из яиц, личинок и нимф комаров показывает, что по крайней мере некоторые вирусы зимуют в природе *in ovo* [13, 22, 28, 94, 148, 173, 257].

Стадии репликации буньявирусов

Об инфекционном процессе, вызываемом буньявирусами, известно немного. Как и в случае других вирусов с оболочкой, адсорбция буньявирусов включает взаимодействие между вирусным гликопротеином и рецепторами поверхности клетки [162]. Природа этих рецепторов пока не установлена. Инфек-

ция может быть подавлена поликлональными и некоторыми моноклональными антителами, специфически взаимодействующими с гликопротеином G1 [103, 107, 108]. Считают, что проникновение в клетку осуществляется за счет фагоцитоза с последующим слиянием (при низком pH) вирусной оболочки с эндосомными мембранами, приводящим к попаданию вирусного нуклеокапсида в цитоплазму.

Предполагают, что после проникновения активация вирусной транскриптазы в трех нуклеокапсидах ведет к синтезу субгеномных мРНК [41]. Транскриптаза, связанная с вирусом, была обнаружена у вируса Лумбо [43, 45], а у вируса зайца-беляка (SSH) показана первичная транскрипция в присутствии ингибиторов синтеза белка [249].

После трансляции запускаются репликация и вторичная транскрипция. За вторичной транскрипцией можно проследить по увеличению скоростей синтеза трех видов комплементарных вирусных мРНК (L, M и S) [249]. В клетках, зараженных SSH, при вторичной транскрипции образуется больше мРНК S, чем мРНК L и M [46, 249]. Если допустить, что буньявирусы подобны рабдовирусам и другим вирусам с негативным геномом, то можно предположить, что переключение с транскрипции на репликацию РНК может определяться доступностью новосинтезированного N-белка. Синтез вирусной РНК нечувствителен к актиномицину D или α -аманитину, т. е. для этого процесса не нужен ДНК-зависимый синтез клеточной РНК [44, 249]. Схема процессов трансляции, репликации и транскрипции S-сегментов РНК буньявирусов показана на рис. 22.5.

Подобно мРНК ортомиксовирусов [133], мРНК буньявирусов имеют на 5'-концах гетерогенные невирусные последова-

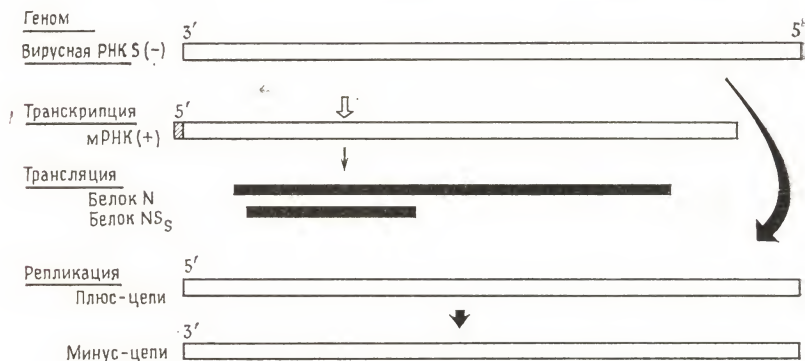


Рис. 22.5. Стратегия кодирования, транскрипции и репликации S-сегмента РНК буньявирусов. Заштрихованная область в мРНК обозначает последовательность невирусной затравки.

тельности [37]. Присутствие таких последовательностей может означать, что они происходят из клеточной мРНК и захватываются транскриптазой для использования в качестве затравки при синтезе мРНК. Если это так, то нечувствительность к актиномицину D указывает на то, что эти гетерогенные последовательности происходят из зрелых клеточных мРНК. Энзимологию этого процесса и то, как эти затравки узнаются и используются, еще предстоит выяснить.

Как описано ниже, молекулярные и генетические исследования показали, что РНК S буньявирусов кодирует как белок N, так и белок NS_s [2, 3, 39, 40, 57, 71, 72, 89, 90, 97]. Результаты клонирования ДНК и анализа последовательности РНК S SSH (рис. 22.6), вируса Ла Кросс (LAC) и вируса Аино [2, 3, 39, 57] и их генных продуктов [89] показали, что два белка транслируются с перекрывающихся рамок считывания в последовательности, комплементарной вирусной РНК. При клонировании 5'-концов индивидуальных мРНК SSH и анализе кДНК-последовательностей популяции мРНК S SSH [37, D.H.L. Bishop, неопубликованные данные] был обнаружен только один тип субгеномной мРНК S. Таким образом, одна мРНК дает и белок N, и белок NS_s. Хотя при трансляции *in vitro* белки N и NS_s образуются в эквимольном соотношении, *in vivo* преобладает белок N [89] (рис. 22.7). Кроме того, у вируса LAC например, *in vivo* накапливается меньше белка NS_s, чем у близкородственного вируса SSH [89]. Возможно, эти особенности можно объяснить разной скоростью внутриклеточного обмена NS_s или различиями в частоте инициации трансляции этого белка.

Получены данные, свидетельствующие о том, что некоторые, но не все мРНК S SSH имеют полиаденилированные 3'-концы [67]. Для вируса SSH показано, что транскрибируемая последовательность оканчивается пятью уридиловыми остатками около 5'-конца матрицы; это позволяет предположить, что полиаденилирование происходит за счет «пробуксовывания» транскриптазы на этом месте (B. Erickson и D.H.L. Bishop, неопубликованные данные). У вируса Аино в 5'-концевой нетранслируемой части сегмента S такая последовательность уридиловых остатков отсутствует [3], и пока не выяснено, полиаденилированы ли 3'-концы мРНК S этого вируса.

Расшифровка последовательности РНК показывает, что белковые продукты кодированы субгеномной вирусной комплементарной последовательностью сегментов L и M буньявирусов [71]. У сегментов M и L РНК 5'- и 3'-концы пока не секвенированы. Генетические и молекулярные исследования показали, что два гликопротеина G1 и G2 и неструктурный белок NS_M кодируются сегментом M (рис. 22.7) [40, 89, 90, 98], тогда

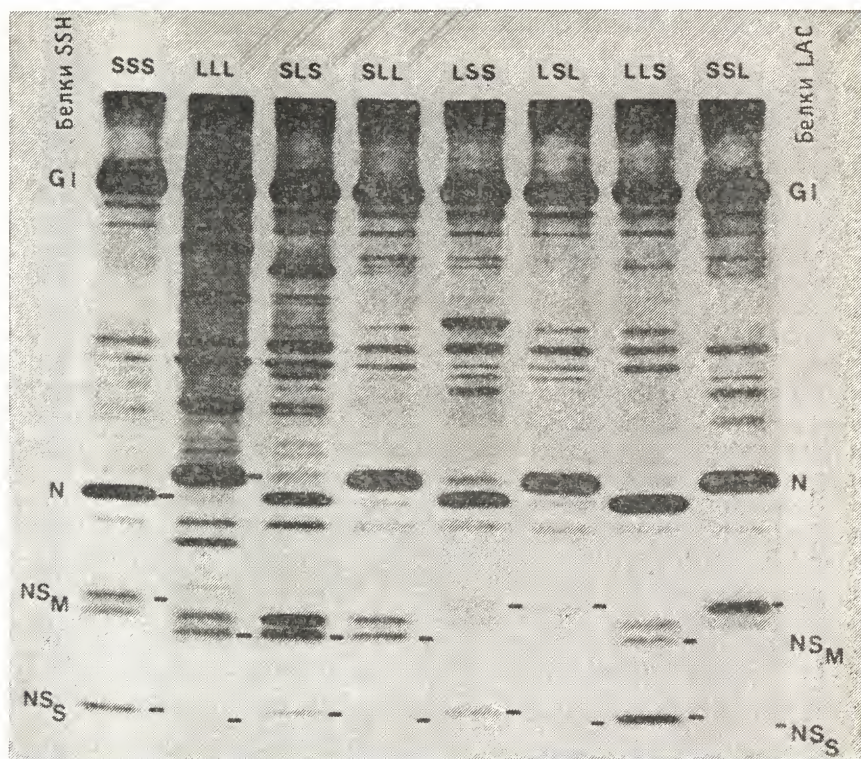


Рис. 22.7. Белки, индуцированные вирусом зайца-беляка [генотип SSH/SSH/SSH L/M/S(SSS)], вирусом Ла Кросс [генотип LAC/LAC/LAC(LLL)] и шестью реассортантами [генотипы SSH/LAC/SSH(SLS), SSH/LAC/LAC(SLL), LAC/SSH/SSH(LSS), LAC/SSH/LAC(LSL), LAC/LAC/SSH(LLS), SSH/SSH/LAC(SSL)]. Указаны белки G1, N, NS_M и NS_S [81]. G2 обнаруживается в экстрактах лишь изредка.

как на долю РНК L остается кодирование L-белка (200 K) — предполагаемого компонента транскриптазы.

Результаты изучения процесса почкования свидетельствуют о том [149], что вирусный морфогенез происходит в аппарате Гольджи зараженных клеток [161] и подавляется моновалентным ионофором мононенсином [64]. Почему вместо плазматических мембран используется аппарат Гольджи? Ответ на этот интересный вопрос прольет свет на клеточные процессы, связанные с регуляцией транспорта гликопротеинов. Каким образом вирусные нуклеокапсиды узнают место морфогенеза и каким образом образуются частицы вирусного потомства, пока неизвестно.

Генетические свойства буньявирусов

Как уже указывалось, генетические исследования пока проведены только с представителями трех серогрупп буньявирусов (Буньямвера, Калифорния и группы С). Была показана реассортация между отдельными представителями каждой серогруппы, однако при использовании членов различных серогрупп реассортации не наблюдали. Олигонуклеотидные фингерпринты сегментов РНК L, М и S различны для разных буньявирусов [31, 74, 131, 208, 243, 244]. Как показано на рис. 22.8, они легко различаются у разных подтипов, вариантов и изолятов вируса (например, у вирусов SSH и LAC), несмотря на то, что их РНК имеет очень сходную последовательность [2]. Таким образом, происхождение того или иного сегмента РНК рекомбинантного вируса, являющегося потомком двух серологически родственных генетически взаимодействующих вирусов, легко определяют простым фингерпринтным анализом [104].

Двойное заражение культуры клеток вирусом LAC дикого типа (генотип LAC/LAC/LAC L/M/S) и SSH дикого типа (генотип SSH/SSH/SSH L/M/S) дает высокий выход реассортантов некоторых типов (SSH/LAC/LAC, SSH/LAC/SSH, SSH/SSH/LAC и LAC/LAC/SSH), но низкий выход реассортантов с генотипами LAC/SSH/LAC и LAC/SSH/SSH [102, 104, D.H.L. Bishop, неопубликованные данные]. При использовании температурочувствительных (*ts*) мутантов по сегментам L и M каждого из родительских вирусов реассортанты дикого типа со структурой LAC/SSH/LAC и LAC/SSH/SSH были получены лишь с очень низкой частотой (менее 1 % всего потомства) и только при высокой множественности заражения за счет агрегации вирионов *ts*-вирусов полиэтиленгликолем [207]. Причина такой неэффективной рекомбинации неизвестна. Реассортанты обладают теми же ростовыми свойствами (время накопления потомства, выход, и т. д.), вирулентностью *in vivo*, способностью к передаче переносчиками, что и вирус SSH, и вирус LAC дикого типа [17, 207, 219].

Для вирусов калифорнийской группы и группы С были получены только *ts*-мутанты по L и M сегментам РНК [36, 38, 102, 104]. Одной из причин отсутствия мутантов по S-сегменту может быть то, что в этом сегменте два белковых продукта закодированы в перекрывающихся рамках считывания [2, 39], и поэтому мутация, приводящая к *ts*-повреждению одного белка, оказывается летальной по другому. Еще одной причиной может быть то, что вирионы часто бывают диплоидными по сегменту S, мутантные сегменты S упаковываются вместе с молекулами дикого типа, и поэтому его не удается обнаружить. Генетические исследования некоторых вирусов серо-

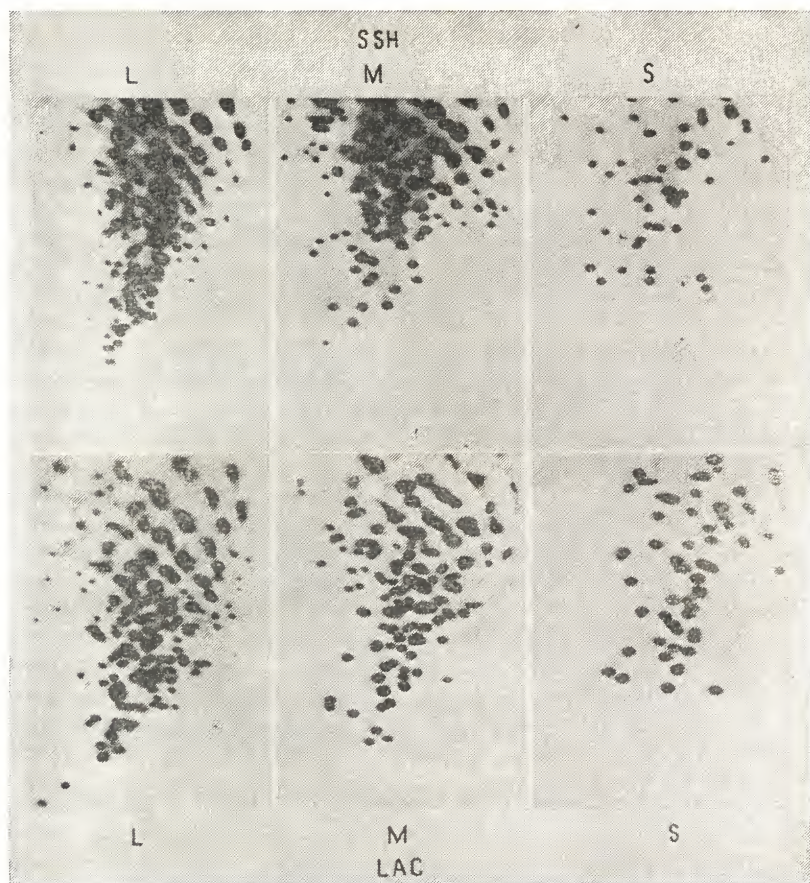


Рис. 22.8. Олигонуклеотидные карты сегментов L, M и S вируса зайца-беляка (SSH) и вируса Ла Кросс (LAC).

группы Буньямвера позволили идентифицировать одну предполагаемую *ts*-мутацию по сегменту S, хотя остается неизвестно, какой из генных продуктов (N или NS_s) поврежден [192].

Совместное заражение *in vivo* комаров *Aedes triseriatus* соответствующими *ts*-мутантами или вирусами дикого типа также не привело к обнаружению реассортантов LAC/SSH/LAC и LAC/SSH/SSH, хотя другие реассортанты были обнаружены [16, 20]. Таким образом, ограниченная реассортация *in vitro* имеет аналогию *in vivo* и может иметь биологическое значение.

Образование реассортантных буньявирусов при совместном заражении комаров *in vivo* является одним из путей возник-

новения рекомбинантных вирусов в природе. Например, если комар сначала насосется крови, содержащей вирус одного типа, а затем крови, содержащей вирус другого, то может произойти двойное заражение клеток пищевода комара и образование рекомбинантного вируса. Можно представить себе и иные ситуации. Показано, однако, что если второе заражение с участием генетически родственного вируса (например, LAC и SSH) происходит с задержкой на несколько дней (что часто происходит при последовательном кормлении комаров некоторых видов), то наблюдается интерференция, суперинфицирующий вирус не размножается и реассортанты не образуются [15]. Если суперинфицирующий вирус не принадлежит к серогруппе или семейству первого вируса (например, является рабдовирусом), то репликация не подавляется [15]. Видимо, характер интерференции определяется уровнем амплификации генов интерферирующего вируса.

Итак, подведем итоги. Тогда как между представителями различных серогрупп буньявирусов рекомбинаций не обнаружено, между представителями одной серогруппы отмечена ограниченная рекомбинация. Эти ограничения объясняют по-разному. Они могут быть связаны с неэффективным взаимодействием генных продуктов или с морфогенетическими процессами, в том числе с упаковкой нуклеокапсидов. Генетические ограничения наблюдали как *in vivo* у комаров, так и *in vitro* в культуре клеток. Несмотря на то что в клетках комара *in vivo* рекомбинация возможна, при отсроченной суперинфекции ей мешает интерференция.

Олигонуклеотидный фингерпринтный анализ различных изолятов буньявирусов (например, LAC), полученных из различных экологических ниш в США, выявил существенную генотипическую изменчивость [131, 208]. Фактически не найдено двух изолятов с идентичными фингерпринтами сегментов L, M и S. Такая вариабельность объясняется, вероятно, ошибками, накапливающимися в ходе репликации РНК, и конкретными энзоотическими взаимоотношениями между переносчиком и хозяином, участвующими в процессе обычного заражения. Хотя заражению подвергаются и другие животные [4], обычными хозяевами вируса LAC, в которых происходит его размножение (например, на Среднем Западе США), являются мелкие млекопитающие (бурундуки и белки) [94, 95, 172, 235], а обычным переносчиком служит *Ae. triseriatus* [13, 22, 28, 94, 110, 155, 173, 232—236, 254—257]. Таким образом, способность LAC к распространению в природе, вероятно, очень ограничена. Можно предположить, что благодаря действию ограничивающих факторов разные популяции LAC непрерывно эволюционируют независимым образом в различных экологиче-

ских нишах. Интересно было бы выяснить, насколько быстро такая эволюция приводит к образованию вирусов, которые можно различить серологически, и какие факторы влияют на их отбор. Способность буньявирусов к вертикальной передаче от родителей к потомству и установлению длительной персистентной инфекции в некоторых членистоногих с вовлечением различных тканей [23, 24, 28, 155, 156, 231, 233, 234, 255—257], вероятно, относится к наиболее важным факторам их выживания в природе. Есть сообщения, что заражение комаров приводит к изменению их поведения в отношении питания [111], но молекулярная основа и биологическое значение этих изменений неизвестны.

В исследованиях по выделению вирусов показано, что некоторые вирусы калифорнийской группы симпатричны в природе (например, LAC и SSH) [116]. Другие обнаруживаются в разных районах мира (например, вирусы Тягиня в Центральной Европе, Инкоо в Скандинавии, Лумбо в Южной Африке, вирус калифорнийского энцефалита на Западе США и LAC в областях США к востоку от Скалистых гор) [25—27, 127, 228]. Каждый из этих вирусов серологически близок и генетически совместим с другими представителями серогруппы (за исключением, возможно, вируса Гуароа). Такие свойства предполагают наличие общего предшественника для вирусов калифорнийской группы — возможно, существовавшего когда-то в определенном районе мира. Если когда-то вирусные изоляты были разнесены по разным районам мира, то резонно предположить, что они пошли по различным путям эволюции, которые привели к образованию различных серотипов, подтипов и вариантов вирусов, обнаруживаемых в настоящее время. Исходя из биологии взаимоотношений между вирусами, их переносчиками и хозяевами можно предположить, что в образование новых очагов энзоотических вирусов были вовлечены такие факторы, как перенос материалов (например, древесины, содержащей яйца комаров), миграция зараженных животных или членистоногих. Буньявирусы птиц и других животных, способных к дальним переселениям, могут распространяться быстрее, чем вирусы калифорнийской группы.

Выделение вирусов от комаров и анализ зараженности переносчиков показали, что одни членистоногие переносят некоторые буньявирусы более эффективно, чем другие. Вирус LAC иногда выделяли из оленей и лошадиных слепней [266]. Но его предпочтительным переносчиком на Среднем Западе США является *Ae. triseriatus*. В других районах этот вирус часто переносят иные виды *Aedes* [25]. По всей видимости, передачу конкретных буньявирусов осуществляет ограниченное число видов членистоногих (комаров). Вопрос о том, какие генетические

свойства вируса и переносчика определяют подобные взаимоотношения, должен быть разрешен в будущих исследованиях.

Неизвестно, различаются ли разные варианты LAC по вирулентности для человека. Судя по фингерпринтам РНК двух штаммов, выделенных от человека в летальных случаях, эти штаммы больше похожи друг на друга, чем вирусы, выделенные от комаров за тот же период времени (18 лет) в том же районе США (шт. Висконсин и Миннесота). Возможно, но не доказано, что варианты LAC, вирулентные для человека, присутствуют только в некоторых районах США. Хотя инфекция, вызванная вирусом LAC, у человека самоограничивается и редко летальна, имеются указания на рекуррентные проявления у больных, переболевших LAC [113]. Идентифицировано несколько природных реассортантов буньявирусов. Один из 25 изолятов LAC, исследовавшихся методом фингерпринтов, представляет собой межтиповой реассортант [131]. Из сравнения фингерпринтов вирусов Шарк Ривер и Пахайоки (серогруппа Патуа) следует, что эти вирусы относятся к реассортантам [243]. Реассортация в природе относительно редка, но все же она происходит. Различия в олигонуклеотидах, наблюдаемые у изолятов LAC [131, 208] и SSH [D.H.L. Bishop, неопубликованные данные], свидетельствуют о том, что эволюция буньявирусов происходит в основном за счет накопления точечных мутаций, делеций и дупликаций.

Как указывалось выше, рекомбинанты вирусов калифорнийской группы использовали для того, чтобы определить, какой из сегментов РНК кодирует каждый из вирусных полипептидов. Сравнение белков рекомбинантного и родительского вирусов с учетом происхождения сегментов РНК позволило определить кодирующие свойства сегментов S и M [89, 90, 97, 98]. Так, вирус LAC/LAC/SSH имеет белки N и NS_S вируса SSH (рис. 22.7). Таким образом, сегмент S кодирует N и NS_S. Аналогичный анализ показал, что сегмент M кодирует G1, G2 и NS_M. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей подтвердил эти результаты [2, 39, 89].

В дополнение к определению кодирующей способности сегментов рекомбинантные вирусы использовали также для определения того, какие вирусные продукты необходимы для передачи комарами [16—19] и проявления вирулентности в модельных и природных хозяевах [196—199]. Используя LAC, SSH и их реассортанты в исследованиях на комарах *Ae. triseriatus* (неприродный хозяин для SSH), было показано, что основными факторами, определяющими эффективное заражение переносчиков LAC и его передачу хозяину, являются продукты генов M-сегмента РНК [17—19]. При пероральном заражении оба вируса (как LAC, так и SSH) одинаково успешно заражают

клетки пищевода комаров *Ae. triseriatus* [19]. Однако LAC и реассортанты, содержащие М-сегмент LAC (например, SSH/LAC/SSH), более эффективны в развитии рассеянной инфекции в этих комарах, чем вирус SSH или реассортанты LAC-SSH, содержащие М-сегмент вируса SSH [19]. Даже если вирусы инокулировать в грудной отдел комаров *Ae. triseriatus*, LAC и реассортанты, содержащие М-сегмент LAC, более успешно передаются хозяевам, чем вирус SSH или реассортанты, содержащие М-сегмент вируса SSH [17]. Поскольку М-сегмент кодирует вирусные гликопротеины, такое сродство вирусов LAC и SSH, возможно, отражает взаимодействие рецепторов с гликопротеинами в клетках комаров разных типов.

Вирулентность вирусов измеряют по смертности или выживаемости молодых мышей, зависящей от дозы внутрибрюшинного заражения (например, для вируса LAC и вируса Тягиня соответственно) [219]. При внутричерепном введении вирулентность определяют по длительности выживания зараженных животных до того момента, когда они погибают [219]. По обоим критериям роль основных факторов вирулентности играют генные продукты сегмента М (вероятно, гликопротеины) [219]. Аналогичные данные получены для исходных и реассортантных буньявирусов серогруппы С [36].

Места развития инфекции в пределах одного органа животного могут различаться для разных вирусов калифорнийской группы [238]. У вирусов группы С органы-мишени могут принципиально различаться даже для двух штаммов одного серотипа [26]. При анализе родительских вирусов и реассортантов показано, что вирулентные свойства висцеротропных и нейротропных вариантов вируса Орибока определяются генными продуктами сегмента М [36].

Итак, можно считать доказанным положение о том, что главными детерминантами вирулентности служат вирусные гликопротеины, но вместе с тем на это свойство могут влиять и другие генные продукты. Это показано на мышах, бурундуках (*Tamias striatus*) и зайцах-беляках (*Lepus americanus*), у которых реассортанты LAC-SSH с мутацией не *ts*-типа в L-сегменте LAC авирулентны по сравнению с родительским вирусом безотносительно к происхождению М-сегмента РНК [207, 218, 219]. Незвестно, до какой степени нарушается репликация и (или) транскрипция вирусной РНК из-за мутации в сегменте L и каким образом дефектный продукт сегмента L приводит к ослаблению вирулентности. Реассортанты LAC-SSH с дефектами в сегменте L не способны также эффективно заражать *Ae. triseriatus* [17, 19]. Таким образом, несмотря на то что основными детерминантами вирулентности являются генные продукты сегмента М, к ослаблению вирулентности могут

приводить также изменения в белках, кодируемых другими сегментами РНК. Вопрос о том, возможно ли усиление вирулентности под действием генных продуктов L- или S-сегментов буньявирусов, остается открытым.

Род *Phlebovirus*

Род *Phlebovirus* включает 37 вирусов (табл. 22.2), классифицированных по перекрестной реакции связывания комплемента, по подавлению гемагглютинации и по перекрестной нейтрализации [25—27, 33, 127, 190, 228, 230, 240]. Помимо африканского вируса Долины Рифт с заболеваниями человека связаны несколько центрально-американских флебовирусов

Таблица 22.2. Предполагаемая серологическая классификация вирусов рода *Phlebovirus* сем. *Bunyaviridae*¹⁾

<u>Группа Неапольской москитной лихорадки</u>	<u>Группа лихорадки Долины Рифт</u>
Неапольская москитная лихорадка	Лихорадка Долины Рифт (Зинга)
Тегеран	Бельтерра ²⁾
Тоскана	Икоараси
Каримабад	
<u>Группа Бужару</u>	<u>Группа Салехабад</u>
Бужару	Салехабад
Мунгуба ²⁾	Арбиа ²⁾
Агвакате	
<u>Группа Кандиру</u>	<u>Группа сицилийской лихорадки</u>
Кандиру	Сицилийская лихорадка РаАг814 ²⁾
Итаитуба	
Никве	Неклассифицированные вирусы
Туруна	Анханга
Ориксимина ²⁾	Арумовот
Пунта Торо	Каимито
Буенавентура	Чагрес
Аленквер	Габек Форест ²⁾
<u>Группа Чилибре</u>	Гордил
Чилибре	Итапоранга
Какао	Пакуи
<u>Группа Фрижолес</u>	Рио Гранде
Фрижолес	Сент-Флорис
Хоа ²⁾	Уркури

¹⁾ Вирусы классифицированы по трем степеням, обозначенным уровнем сдвига строки: комплекс, вирус и подтип; вирусы, указанные в скобках, являются вариантами.

²⁾ Эти вирусы не включены в Международный каталог арбовирусов [25, 127].

[229]. Серологическое группирование, приведенное в табл. 22.2, отражает взаимоотношения, выявляемые по перекрестной нейтрализации инфекционности. В отличие от серогрупп буньявирусов оно не отражает отношений, выявляемых по подавлению гемагглютинации. Серологические взаимоотношения между флебовирусами обсуждаются в другой главе. Неясно, в какой степени различные вирусы рода *Phlebovirus* генетически совместимы. Предварительное исследование с использованием вирусов Пунто Торо (PT) и Буэнавентура (BUE) дикого типа или их *ts*-мутантов показывает, что эти два вируса не взаимодействуют генетически [D. H. L. Bishop, неопубликованные данные]. При двойном заражении с использованием штаммов, которые можно дифференцировать по фингерпринтам, были выделены межтиповые реассортанты PT [D. H. L. Bishop, неопубликованные данные].

Ниже приводятся свойства вирусов рода *Phlebovirus*. В настоящее время получены данные о существенных различиях, позволяющих сомневаться в правомерности помещения флебовирусов в одно семейство с буньявирусами.

1. Флебовирусы окружены внешней оболочкой, чувствительны к растворителям липидов, имеют диаметр 90—100 нм. Их гликопротеины хорошо различаются на поверхности частиц [203, 222].
2. На поверхности вирусов присутствуют два вирусных гликопротеина (G1, 60—70K, и G2, 50—60K) в эквимоллярных количествах [203]. Гликопротеины индуцируют образование нейтрализующих антител и взаимодействуют с ними [77, 78]. Их роль в передаче переносчиками и определении степени вирулентности пока не установлена.
3. Имеются три типа вирусных нуклеокапсидов (L, M и S), каждый из которых содержит определенный вид РНК, связанной с многими копиями белка нуклеокапсида (N, 20—30K) и несколькими копиями большого белка (150—200K), который, как считают, является компонентом транскриптазы [66, 201, 203]. Вирусные РНК имеют мол. массы $\sim 3 \cdot 10^6$ (L), $2 \cdot 10^6$ (M) и $0,7—0,8 \cdot 10^6$ (S) [34, 66, 201, 203].
4. S-Сегмент вирусной РНК кодирует два белка [122]. У РТ один белок (N, 27K) считается с субгеномной мРНК, комплементарной 3'-концевой половине вирусной РНК [122]. Другой белок (NS?, 29K) считается с субгеномной мРНК той же полярности, что вирионная; она соответствует 5'-концевой половине РНК [122]. Для обозначения РНК, участвующей в такой смешанной стратегии кодирования, был предложен термин «амбиполярная» (ambisense) геномная РНК [122].

5. Стратегия кодирования М- и L-сегментов РНК пока не определена.
6. Три вирусные РНК имеют общую консенсусную последовательность 3'-конца: UGUGUUUCG... и комплементарную ей последовательность на 5'-конце [122]. Состав и концевые последовательности вирус-специфических мРНК еще предстоит определить.
7. Морфогенез вирусов происходит в аппарате Гольджи зараженных клеток [222].
8. Рекомбинацию за счет обмена сегментами (реассортацию) вирусной РНК пока наблюдали только между отличными друг от друга изолятами одного серотипа вируса (D. H. L. Bishop, неопубликованные данные).

Стадии репликации флебовирусов

Об этапах и процессах, участвующих в репликации флебовирусов, пока ничего не известно. Клонирование ДНК и определение аминокислотной последовательности [122] позволили установить, что белок N вируса РТ кодируется комплементарной последовательностью S-сегмента РНК (в 3'-концевой половине). Другой белок (неструктурный белок NS?) кодируется 5'-концевой половиной сегмента S [122]. Таким образом, вирус имеет амбиполярную РНК, т. е. одновременно и позитивную, и негативную. Межгенная область богата последовательностями как уридилowych, так и адениловых остатков [122]. Гибридизационный анализ позволил обнаружить дискретные субгеномные мРНК в экстрактах зараженных клеток, которые соответствуют двум генам S-сегмента [122].

Белок NS вируса РТ пока не обнаружен в клеточных экстрактах. Однако неструктурные белки с размерами того же порядка (29—31К) наблюдали в клетках, зараженных вирусом Каримабад [D. H. L. Bishop, неопубликованные данные] и вирусом лихорадки Долины Рифт (RVF) [226, 227]. Получены данные о том, что неструктурный белок вируса RVF является фосфопротеином, связанным с ядром [226, 227]. Соответствует ли этот белок белку NS, кодируемому S-сегментом РНК вируса РТ, неизвестно.

Представления о стратегии кодирования и переносе информации у вируса РТ суммированы на рис. 22.9. Если вирионы флебовирусов содержат единственный вид S-РНК (т. е. 3'-N-NS-5'), на что указывают данные определения нуклеотидной последовательности, то, поскольку вирусная РНК не является мРНК, белок NS не может образовываться до тех пор, пока не начнется репликация. Такая стратегия кодирования сильно отличается от стратегии других вирусов, за исключе-

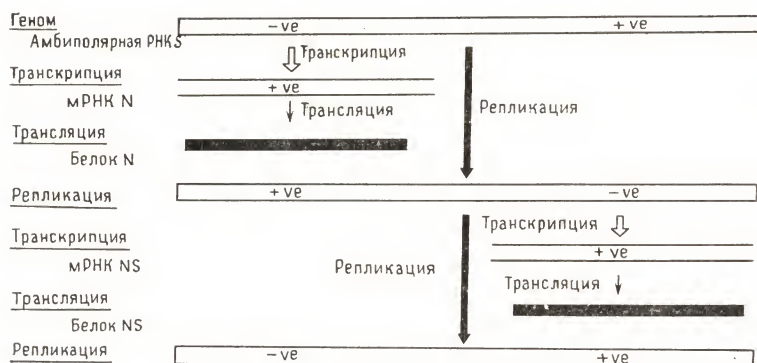


Рис. 22.9. Стратегия кодирования, транскрипции и репликации сегмента S флебовируса Пунта Торо (PT).

нием аренавирусов, рассмотренных ниже [12]. В свете этих наблюдений правомерность помещения флебовирусов в одно семейство с буньявирусами сомнительна.

Особый интерес представляет определение функции белка NS. Маловероятно, что белок NS участвует в транскрипции мРНК или в начальной фазе репликации во время синтеза полной комплементарной РНК (если только не окажется, что он присутствует в вирионах и просто не был обнаружен). Возможно, что белок NS участвует в морфогенетических процессах и (или) во взаимодействии с активными компонентами хозяйской клетки, что могло бы вести, например, к блокированию ядерных функций и трансляции клеточных мРНК или транспорта гликопротеинов к плазматической мембране.

Можно предположить, что амбиполярная РНК когда-то синтезировалась на двух разных РНК-сегментах, которые за счет ошибки репликации вошли в состав одной молекулы РНК (например, отдельные РНК 3'-А-Н-5' и 3'-К-Р-5' могли дать РНК 3'-А-Н, Р'-К'-5', где Р'-К' представляет собой инвертированную последовательность, комплементарную К-Р). Такой гибрид может быть жизнеспособным лишь в предположении, что продукт гена К-Р нужен только для поздних стадий инфекционного цикла.

Род *Nairovirus*

Род *Nairovirus* подразделяется на шесть переносимых клещами серогрупп вирусов (табл. 22.3) на основе реакции связывания комплемента, подавления гемагглютинации и нейтра-

Таблица 22.3. Предполагаемая серологическая классификация вирусов рода *Nairovirus* сем. *Bunyaviridae*¹⁾

<u>Группа Крымской геморрагической лихорадки (Конго)</u>	Раза ²⁾ Сапфир ²⁾ Солдадо Зирка
Крымская геморрагическая лихорадка (Конго) Хазара	<u>Группа болезни овец Найроби</u>
<u>Группа Дера Гази Хан</u>	Болезнь овец Найроби (Ганджам) Дугбе
Дера Гази Хан Абу Хаммад Абу Мина ²⁾ Као Шуан Патум Тани Претория	<u>Группа Кальюб</u>
<u>Группа Хьюз</u>	Кальюб Бандия Омо
Хьюз Фераллон ²⁾ Фрезер Пойнт ²⁾ Пунта Салинас	<u>Сахалинская группа</u>
	Сахалин (Тилламук ²⁾) Кло Мор Таггерт Авалон Парамушир

¹⁾ Вирусы классифицированы по трем степеням, обозначенным уровнем сдвига строки: комплекс, вирус и подтип; вирусы, указанные в скобках, являются вариантами.

²⁾ Эти вирусы не включены в Международный каталог арбовирусов [25, 127].

лизации инфекционности [25—27, 33, 63, 127, 190, 191, 228]. У вирусов этого рода не обнаружено серологического родства ни с одним из представителей других родов буньявирусов [56]. Белки, а также РНК и их 3'-концы сильно отличаются от таковых у буньявирусов, укукириусов и флебовирусов [33, 34, 69, 70, 73, 87]. Хотя ничего не известно о стратегии кодирования и репликации наировирусов, на основе предварительных данных об их гликопротеинах ясно, что в ходе синтеза существует много промежуточных внутриклеточных стадий [69, 70]. В препаратах некоторых наировирусов, например у вируса Кальюб [69], наблюдали причудливые поверхностные структуры. К родовым свойствам наировирусов относятся следующие.

1. Наировирусы имеют внешнюю оболочку, чувствительны к растворителям липидов, имеют диаметр 90-120 нм; их гликопротеины хорошо различаются на поверхности частиц [41, 69].
2. На поверхности вирионов находятся два гликопротеина (G1, 72—84K; G2, 30—40K) [69, 70]. У вируса Хазара три гликопротеина (84K, 45K, 30K) [87].
3. Каждый из трех нуклеокапсидов (L, M и S) содержит уникальную РНК, много копий белка нуклеокапсида (N, 48—

- 54K) и незначительные количества большого белка (200K) [69, 70]. Вирусные РНК имеют мол. массы $(4,1-4,9) \cdot 10^6$ (L), $(1,5-1,9) \cdot 10^6$ (M) и $(0,6-0,7) \cdot 10^6$ (S) [69, 70].
4. Кодированные способности РНК пока не определены.
 5. Три вирусные РНК имеют общую консенсусную последовательность (3') AGAGUUUCU... [73]. Концы вирус-специфических РНК не исследовали.
 6. Способность представителей рода к генетической рекомбинации не выяснена.

Род *Uukuvirus*

Род *Uukuvirus* составляет одна серогруппа вирусов, переносимых клещами (табл. 22.4). Прототипный вирус Укуниими (UUK) выделен первоначально из напившихся кровью клещей *Ixodes ricinus*, собранных на коровах в 1960 г. в Укуниими

Таблица 22.4. Предполагаемая серологическая классификация вирусов рода *Uukuvirus*, сем. *Bunyaviridae*¹⁾

Группа Укуниими

Укуниими
Ошнсайд²⁾
EgAn1825-61²⁾
Гранд Арбо
Манава
Понтевес
Залив Терпения

¹⁾ Вирусы классифицированы по трем ступеням, обозначенным уровнем сдвига строки: комплекс, вирус и подтип.

²⁾ Эти вирусы не включены в Международный каталог арбовирусов [25, 127].

в юго-восточной Финляндии [167]. Изоляты вируса получены также в различных районах Скандинавии, восточной Европы и Советского Союза [25]. Другие вирусы выделены из клещей, собранных в различных районах мира: в СССР, США, Египте и Франции [25—27, 33, 127, 190, 191, 228]. Они оказались родственными вирусу Укуниими по реакции связывания комплекта, подавления гемагглютинации и нейтрализации инфекционности.

Структурные исследования вируса Укуниими показывают, что он имеет оболочку, чувствительную к растворителям липидов, а его плавающая плотность составляет $1,17-1,19$ г/см³ в сахарозе и $1,20$ г/см³ в хлориде цезия [184, 250]. Как и у других членов семейства, коэффициент седиментации уукувирусов находится в пределах 350—470 S [184]. Химический анализ по-

казывает, что вирионы содержат примерно 2 % РНК, 58 % белка, 33 % липидов, 7 % углеводов [165] и обладают фосфолипидами, сходными по составу с фосфолипидами вируса леса Семлики и слегка отличающимися от фосфолипидов хозяйских клеток ВНК-21 [200]. У вируса Уукуннии найдено три нековалентно замкнутых кольцевых нуклеокапсида и столько же видов РНК [117, 174, 182, 185]. Как и у других членов семейства, в препаратах вируса различные виды РНК редко обнаруживаются в эквимольном соотношении. Исследование процессов денатурации — ренатурации с помощью электронного микроскопа, а также определение последовательностей 5'- и 3'-концов показало, что концы комплементарны; это дает возможность образовываться нековалентно замкнутым кольцевым молекулам [117, 174].

Анализ белков вируса UUK показал наличие двух гликопротеинов, основного белка нуклеокапсида и минорных количеств большого белка [184, 185, 251]. Гликопротеины видны как хорошо различимые пустые цилиндрические морфологические единицы длиной 8—10 нм диаметром 10—12 нм и с центральной полостью размером 5 нм [209—211, 250]. Негативное окрашивание и фиксация препаратов UUK глутаральдегидом с последующим применением техники замораживания — скалывания показывает, что поверхностные единицы являются кластерами пентонов — гексонов, уложенных в икосаэдрическую решетку с $T=12$, $P=3$ и расстоянием между гексонами $\sim 12,5$ —16 нм для окрашенных частиц и 17 нм для замороженных [250]. Анализ трансляции РНК *in vitro* позволяет предположить, что два гликопротеина происходят из общего предшественника [242].

В препаратах вируса UUK обнаружена активность РНК-зависимой РНК-полимеразы [195]. Является ли сегмент S РНК этих вирусов амбиполярным, неизвестно.

Ниже перечислены родовые свойства вирусов *Uukuvirus*.

1. Уукувирусы имеют внешнюю оболочку, чувствительны к растворителям липидов; после фиксации глутаровым альдегидом диаметр частицы составляет примерно 100 нм; гликопротеины хорошо различаются на поверхности частиц [184, 210, 211, 250, 252].
2. Два гликопротеина имеют размеры 75K (G1) и 65K (G2). Полисахариды связаны с аспарагином и принадлежат к сложному высокоманнозному и промежуточному типам, причем G2 содержит большую часть цепей с высоким содержанием маннозы [181]. По-видимому, гликопротеины происходят из общего предшественника [242].
3. Идентифицировано три типа кольцевых нуклеокапсидов (L, M и S), каждый из которых содержит свою уникальную РНК,

много копий белка нуклеокапсида (N, 20—25K) и незначительное количество большого белка (145K), который может быть компонентом транскриптазы [117, 174, 182—185]. Сегменты вирусной РНК имеют мол. массы $(2—3) \cdot 10^6$ (L), $(0,9—1,3) \cdot 10^6$ (M) и $(0,5—0,8) \cdot 10^6$ (S) [174, 182].

4. Кодирующие функции сегментов вирусных РНК пока не определены. В препаратах вируса обнаружена РНК-зависимая РНК-полимераза [195].
5. Сегменты вирусной РНК имеют общую консенсусную последовательность (3') UGUGUUUCUGGAG... и комплементарную ей (5')-последовательность [174]. Концы вирус-специфических мРНК не анализировали.
6. Способность вирусов к генетической рекомбинации не исследовали.

Неклассифицированные вирусы: вирус Хантаан

Из всех вирусов, считающихся потенциальными членами сем. Bunyaviridae, данные о структуре и репликации известны лишь для вируса Хантаан (табл. 22.5). Некоторые некласси-

Таблица 22.5. Предполагаемая серологическая классификация вирусов сем. Bunyaviridae (неклассифицированные вирусы)¹⁾

Группа Бакау	Группа Йогуэ
Бакау Кетапанг	Йогуэ Касокеро ²⁾
Группа Кайсоди	Неклассифицированные вирусы
Кайсоди Ланьян Сильверуотер	Белмонт Бханджа Кетерах (Иссык-Куль) Хасан Кованьяма Лоун Стар Раздан Сандэй Каньон Тамди Татагине Витватерспранд
Группа Хантаан	
Хантаан Эпидемическая нефропатия ²⁾ Прспект Хилл ²⁾ Чупитулас ²⁾	
Группа Мапутта	
Мапутта Маприк Ган Ган Трубанамам	

¹⁾ Вирусы классифицированы по трем ступеням, обозначенным уровнем сдвига строки: комплекс, вирус и подтип; вирусы, указанные в скобках, являются вариантами.

²⁾ Эти вирусы не включены в Международный каталог арбовирусов [25, 127].

фицированные возбудители были выделены от клещей, другие от комаров [25—27, 33, 127, 190, 191, 228]. Вирус Хантаан от членистоногих не выделяли, а большинство изолятов было получено от грызунов [91, 135, 136, 265]. В связи с важностью этого вируса как возбудителя заболевания человека недавно было проведено несколько исследований вируса Хантаан и родственных ему вирусов. Болезни, описываемые общим названием «геморрагическая лихорадка с почечным синдромом», включают корейскую геморрагическую лихорадку (КорГЛ), эпидемическую геморрагическую лихорадку и эпидемическую нефропатию [91, 265]. Эти заболевания эпидемичны и эндемичны в некоторых районах Китая, СССР, Скандинавии, Европы и Кореи [91, 265].

Вирус Хантаан выделен первоначально от корейской полевки *Apodemus agrarius corea* [130, 135, 136]. Его считают этиологическим агентом КорГЛ или близким родственником возбудителя [135, 136]. Этот вывод подкрепляется эпидемиологическими данными, перекрестными реакциями с человеческими сыворотками реконвалесцентов и результатами случайного лабораторного заражения. Присутствие вирусов, родственных вирусу Хантаан, в различных районах мира, включая Северную Америку (у крыс *Rattus norvegicus* и полевок *Microtus*), показывает, что эти вирусы широко распространены в природе [241].

Биохимические и структурные данные подтверждают предположительное помещение вирусов группы Хантаан в самостоятельный род сем. *Bunyaviridae*. Вирионы вируса Хантаан имеют внешнюю оболочку, а их диаметр и коэффициент седиментации сходны с таковыми для других буньявирусов [152, 264]. Наличие трех видов вирусной РНК [L с мол. массой $(2,2-3,6) \cdot 10^6$; M с мол. массой $(1,4-1,9) \cdot 10^6$ и S с мол. массой $(0,6-0,75) \cdot 10^6$] и связанной с вирионами РНК-полимеразы согласуется с данными, сообщавшимися для других членов семейства [215—217]. Белок нуклеокапсида вируса Хантаан и родственных ему вирусов имеет мол. массу 50—52K, а три сегмента РНК обладают общим консенсусом (3') AUCAUCAUCUG... [215; 216]; C. Schmaljohn, J. Dalrymple, неопубликованные данные), похожим на консенсус буньявирусов [(3') UCAUCACAUG].

Arenaviridae

Сем. *Arenaviridae* включает 13 вирусов, которые подразделяют на виды Старого и Нового Света (табл. 22.6) [6, 56, 58, 81, 88, 106, 125, 126, 153, 175, 187—189, 205, 239, 258, 267]. Биологическим и иммунологическим свойствам аренавирусов посвящено несколько обзоров, поэтому мы не будем их здесь приводить [55, 62, 121, 138, 139, 179, 199]. Вирусы получены от различных видов грызунов (или, как в случае вируса Такарибе, от питаю-

Таблица 22.6. Аренавирусы

Вирус	Распространение	Основной хозяин	Источник данных
Виды Старого Света			
LCM	По всему миру	<i>Mus musculus</i>	[6]
Ласса	Западная Африка	<i>Mastomys natalensis</i>	[56, 88]
Мобала	Центральноафриканская Республика	<i>Praomys jacksonii</i>	[106]
Мопейя	Мозамбик	<i>Mastomys natalensis</i>	[267]
Виды Нового Света: комплекс Такарибе			
Амапари	Бразилия	<i>Oryzomys goeldi</i>	[188, 189]
Флексаль	»	<i>Neacomys guianae</i>	
Хунин	Аргентина	<i>Oryzomys</i> sp. <i>Calomys laucha</i> <i>Calomys musculinus</i> <i>Akodon azarae</i>	[175]
Латино	Боливия	<i>Calomys callosus</i>	[126]
Мачупо	»	То же	[125]
Парана	Парагвай	<i>Oryzomys buccinatus</i>	[258]
Пичинде	Колумбия	<i>Oryzomys albigularis</i>	[239]
Такарибе	Тринидад	<i>Artibeus literatus</i> <i>Artibeus jamaicensis</i>	[81]
Тамнами	Флорида	<i>Sigmodon hispidus</i>	[58]

щихся фруктами летучих мышей *Artibeus*) и от людей, как в случае вирусов Хунин, Мачупо, Ласса и LCM, являющихся возбудителями соответственно аргентинской геморрагической лихорадки, боливийской геморрагической лихорадки, лихорадки Ласса и асептического лимфоцитарного хориоменингита. Последние 4 вируса вызывают заболевания человека, которые могут быть тяжелыми и иногда летальными. Прототипом семейства является вирус LCM [6, 7], который был выделен как от мышей, так и от людей [7, 142, 202]. Термин «аренавирусы» происходит от латинского агена, агепосус (песок, песчаный) [187, 205]. Эти вирусы получили свое название из-за рибосом, которые на тонких срезах придают зернистый, «песчаный» вид частицам. Одним из свойств аренавирусов, делающих их интересными для исследования, является их способность легко вызывать персистентные инфекции у новорожденных животных и в культуре клеток [198].

Первоначальное описание серологических взаимоотношений и структурного сходства между членами группы Такарибе аренавирусов Нового Света и аренавирусами Старого Света (табл. 22.6) [79, 158—160, 206] в последующем было дополнено анализом антигенной специфичности с использованием пере-

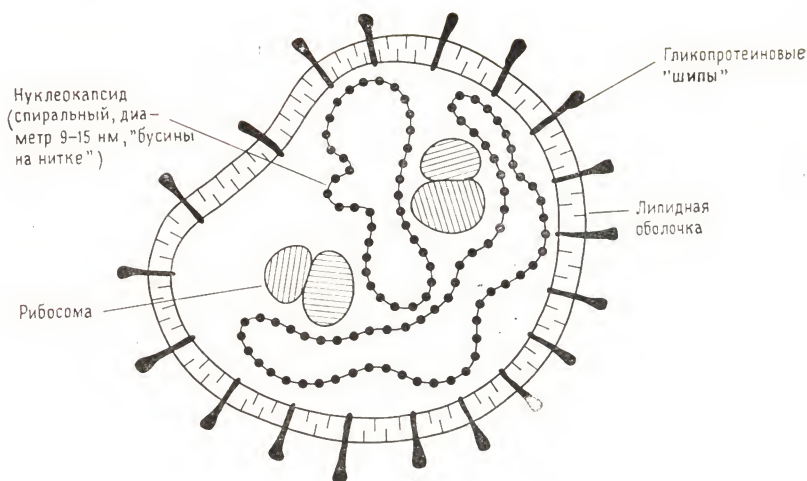


Рис. 22.10. Схематическое изображение структуры аренавируса.

крестно реагирующих моноклональных антител, а также дальнейшим структурным анализом и анализом генотипа [50, 51, 54, 76, 186, 197].

Как показано на схеме, приведенной на рис. 22.10, аренавирусы относятся к вирусам с внешней оболочкой, чувствительной к растворителям липидов; размер их плейоморфных частиц варьирует от 50 до 300 нм [79, 112, 158—160, 166, 223]. Вирусы созревают в результате почкования от плазматической мембраны хозяйской клетки, захватывая при этом рибосомоподобные структуры [150, 158—160]. Плавучая плотность вирусных частиц равна 1,17—1,18 г/см³ в сахарозе, 1,18—1,20 г/см³ в хлористом цезии и 1,14 г/см³ в амидотриазоле, а коэффициент седиментации ≈ 500 S [186, 199]. Поверхностные выступы вируса с размером 5—10 нм обычно нерегулярны, немногочисленны и имеют форму булавы [93, 159, 160, 248, 260]. На продольных срезах они выглядят пустыми [160]. На срезах вирусных частиц почти нет никаких структур, однако часто наблюдается переменное число электроноплотных гранул, напоминающих рибосомы (20-30 нм в диаметре). Присутствие рибосом подтверждается выделением рибосом и их субчастиц из препаратов вируса, а также выделением и идентификацией с помощью фингерпринтов метилированных рибосомных 28S- и 18S-РНК клетки-хозяина [5, 59, 68, 86, 105, 177, 178, 180, 194, 247, 248]. При размножении вируса в присутствии низких концентраций актиномицина D включение метки в рибосомную РНК ингибируется [59, 117]. Внутренние нуклео-

капсиды аренавирусов, состоящие из вирусных РНК и белка (N или NP), видны как напоминающие бусы, слабо скрученные кольцевые структуры (толщиной 9-15 нм) с основными параметрами 400—600 и 1000—1300 нм [93, 171, 248, 268, 269]. Каждая отдельная бусина, которая может быть местом скопления белка нуклеопротеина, имеет диаметр 3—4 нм и отстоит от соседней на расстоянии ~ 5 нм [268]. В составе нуклеокапсида РНК чувствительна к обработке РНКазой. В вирионах и нуклеокапсидах вируса Пичинде идентифицирована РНК-зависимая РНК-полимераза [60, 145]. Гомополимеразная активность [145] связана с рибосомами, находящимися в вирионах, но ее функция пока неясна.

В дополнение к метилированным рибосомным РНК (28S-РНК и 18S-РНК) и малым 4—7S-РНК, препараты аренавирусов содержат обычно РНК двух основных типов: большую РНК [L, 30—35S, мол. масса $(2-3,2) \cdot 10^6$], и малую РНК [S, 20—25S, мол. масса $(1,1-1,6) \cdot 10^6$] [5, 59, 80, 82, 83, 128, 176—179, 194, 247]. Вирусные РНК L и S имеют различные олигонуклеотидные карты, не имеют 3'-концевой poly(A) и метилированного кэпа, не стимулируют синтез белка *in vitro* и содержат различную генетическую информацию [9, 10, 30, 32, 59, 76, 82, 105, 129, 143, 144, 146, 204, 247]. Анализ нескольких аренавирусов показал, что РНК L и S имеют общую консенсусную последовательность на 3'-конце [8, 9], которая, по крайней мере у вируса Пичинде, комплементарна 5'-концу [12]. В результате исследований клонированной ДНК для мол. массы РНК S вируса Пичинде была получена величина $1,16 \cdot 10^6$, а для процентного содержания оснований следующие величины: 28,4% U, 22,6% C, 26,8% A и 22,2% G [12]. Иногда в препаратах вирусов обнаруживали также еще одну РНК с константой седиментации 15S [80, 83, 86, 247]. Анализ блот-гибридизацией с использованием разделенных цепей ДНК, соответствующих плюс- и минус-цепям РНК S, показывает, что фракция 15S-РНК содержит субгеномную мРНК, кодирующую вирусный белок нуклеопротеина N [10]. С помощью подобных методов было также обнаружено, что препараты вируса содержат небольшое количество РНК, комплементарной сегменту S и соответствующей ему по размеру [12]. Возможно, именно этим объясняется тот факт, что при самоотжиге выделенной РНК в зависимости от ее концентрации образуются большие количества (10—30 %) рибонуклеазоустойчивых дуплексов [247].

Разнообразие видов РНК, обнаруживаемых у аренавирусов, ясно показывает, что эти вирусы не имеют механизма для четкого выбора компонентов, участвующих в морфогенезе, характерного для многих других вирусов, например рабдовирусов. Дает ли это свойство им какое-то преимущество при заражении, неизвестно. Отметим также, что частицы аренавирусов часто

бывают генетически диплоидными (т. е. содержат более одной копии сегмента S), что, возможно, имеет биологическое значение [204].

Присутствие рибосом в частицах аренавирусов может быть случайным в силу плейоморфного характера вирионов и скопления (предполагаемого) рибосом в местах созревания. Рибосомы, выделенные из вирусных частиц, способны синтезировать белок при добавлении необходимых кофакторов и мРНК [68]. При использовании для размножения вируса клеток с *ts*-рибосомами обнаружили, что потомство вируса может вызывать последующую продуктивную инфекцию при таких температурах, когда дестабилизированы рибосомные частицы [147]. Возможно, что 15S-мРНК N связана с рибосомами и также включается случайно. Однако не исключено, что на ранних этапах инфекции рибосомы и мРНК дают генные продукты.

В препаратах аренавирусов идентифицировано три основных белка [42, 48—54, 80, 92, 93, 109, 114—116, 128, 144, 151, 179, 193, 212, 248]. На поверхности вирионов располагаются два гликопротеина примерно в равной пропорции [248]. У вирусов Пичинде и LCM белки G1 и G2 имеют различные триптические карты [53, 113—115]. Они составляют примерно 25 % белковой массы и имеют мол. массы 44—72К (G1) и 34—40К (G2) [48, 53, 92, 114—116, 128, 248]. В клетках, зараженных аренавирусами, обнаружен гликозилированный предшественник обоих гликопротеинов, имеющий мол. массу 79К [48, 114—116]. Оба гликопротеина можно удалить с поверхности вирионов обработкой протеолитическими ферментами [51, 93, 248]. О полисахаридных боковых цепях гликопротеинов аренавирусов известно мало [42]. На основании данных о включении предшественников углеводов для большинства аренавирусов показано, что G1 гликозилирован сильнее, чем G2 [48, 151, 193, 248]. Моноклональные антитела к белку G1 вируса LCM нейтрализуют инфекционность эффективнее, чем моноклональные антитела к G2 [50]. У вирусов Хунин, Такарибе и Тамiami идентифицированы гликопротеины лишь одного вида [84]. В гликопротеине [93, 248] или во внутреннем нуклеокапсидном белке N вируса Пичинде с мол. массой 60—70К [51, 93, 193, 248] не обнаружено ни сульфатных, ни фосфатных групп. Однако есть сообщение о протеинкиназе, присутствующей в вирионах LCM и использующей в качестве субстрата белок N [120]. Большую часть (70 %) вирионных белков составляет перекрестно-реактивный белок нуклеопротеина [50—52]. У вируса Пичинде его количество оценивается в 1500 молекул на один вирион, а количество белков G1 и G2 в ~400 молекул каждого [248].

В дополнение к трем основным белкам в вирионах содержится минорное количество большого негликозилированного

белка (L, 200K) [114—116]. По аналогии с рабдовирусами и парамиксовирусами можно предположить, что этот белок является компонентом транскриптазы. Описаны также и другие минорные белки, часто, но непостоянно обнаруживаемые в препаратах аренавирусов [76, 93, 105, 115, 193]. Они включают белок Р с мол. массой 72К [93] и 6 небольших белков с мол. массами, варьирующими от 14 до 48К [115]. На основе триптического картирования предполагают, что эти белки происходят из белка N [115].

ДНК-клонирование РНК аренавируса Пичинде показало, что в S-сегменте закодировано два больших генных продукта [10—12]. Один из них, N, кодируется вирус-специфической комплементарной субгеномной мРНК, соответствующей 3'-концевой части РНК S [10]. Предполагают, что мол. масса первичного продукта трансляции составляет 63К [10]. Второй белок, GPC, кодирован субгеномной мРНК геномной полярности, соответствующей 5'-концевой половине вирусной РНК S [12]. Этот генный продукт с мол. массой (в негликозилированной форме) 57,3К богат остатками цистеина и содержит участки потенциального гликозилирования по аспарагиновым остаткам [12]. В соответствии с этим наблюдением находятся данные рекомбинационного анализа, свидетельствующие о том, что сегмент S кодирует белок N и два вирусных гликопротеина [114, 246]. Анализ блот-гибридизацией с использованием вирус-специфических одноцепочечных ДНК обеих полярностей в качестве зондов позволил установить, что в клетках, зараженных вирусом Пичинде, присутствуют дискретные субгеномные мРНК вирионной полярности (для GPC) и комплементарные вирионной РНК (для белка N) [12]. Таким образом, эти данные показывают, что аренавирусная РНК S использует амбиполярную стратегию кодирования (рис. 22.11) [12].

Интересной особенностью последовательности сегмента S вируса Пичинде является присутствие в межгенной центральной области РНК шпилькообразной структуры, содержащей 18 GC- и 4 AT-пары [10]. Получены данные, указывающие на то, что эта последовательность действует как терминатор транскрипции [M. Galinski, D. H. L. Bishop, неопубликованные результаты]. Между концом кодирующей области и межгенной шпилькой нет уридиловых последовательностей [10]. Это подтверждается также данными, согласно которым мРНК для белка N не содержит 3'-концевого poly (A) [12].

Как уже обсуждалось выше для флебовирусов, происхождение амбиполярной РНК S аренавирусов может быть связано с ошибкой репликации, при которой две отдельные РНК, каждая из которых кодирует свой особый продукт, например N и GPC, объединились вместе при репликации РНК. Если N пред-

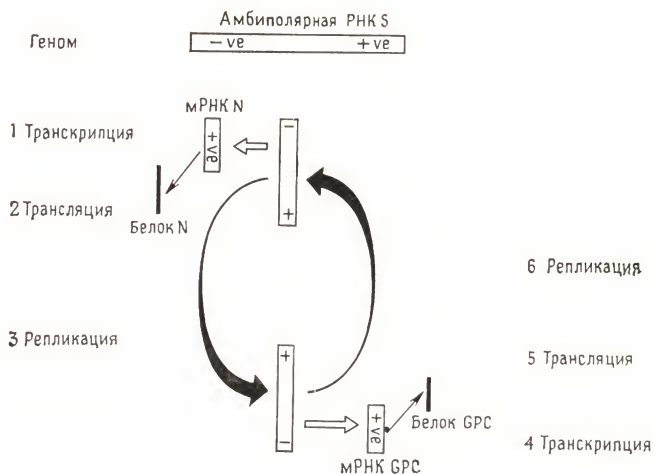


Рис. 22.11. Стратегия кодирования, транскрипции, трансляции и репликации сегмента S РНК аренавирусов. Приведена основанная на расположении генов последовательность событий, необходимых для получения продуктов, закодированных в генах сегмента S РНК вируса Пичинде.

ставлен последовательностью А—L, а GPC последовательностью О—Z, то такая объединенная РНК будет иметь последовательность А—L, Z'—О', где Z'—О'—это инвертированная последовательность, комплементарная О—Z.

У всех семейств РНК-содержащих вирусов с внешней оболочкой, исследованных до настоящего времени, гликопротеины вируса требуются только в конце инфекционного цикла. Вероятно, GPC также не нужен на начальных этапах заражения, когда происходят первичная транскрипция мРНК L и N, трансляция белков L и N и синтез комплементарной РНК. Синтез мРНК GPC на промежуточных продуктах репликации РНК может быть полезным для инфекционного процесса, поскольку он регулируется независимо от синтеза мРНК белка N. Например, если промежуточный комплементарный продукт репликации РНК накапливается в клетке в меньшем количестве, чем вирусная РНК, то синтез мРНК GPC также снижается. Кроме того, если в связи с наличием свободного белка N комплементарные промежуточные продукты используются для репликации, а не для синтеза мРНК GPC, то синтез мРНК GPC при этом блокируется. Могут быть предложены и другие механизмы. Однако несомненно, что возможно полное отключение синтеза мРНК GPC (и, таким образом, синтеза вирусных гликопротеинов). При этих условиях скорее всего не будет образо-

вываться никаких поверхностных антигенов вируса и, следовательно, вирусных частиц. Подобен ли этот механизм тому, благодаря которому аренавирусы дают персистентную инфекцию *in vitro* и у новорожденных, неизвестно. Как обсуждается ниже, при персистентной инфекции в культурах клеток практически не происходит экспрессии гликопротеинов вируса и сборки инфекционных вирусных частиц, хотя они содержат достаточное количество вирусных нуклеокапсидов [105].

Пути заражения и процессы, происходящие при заражении клетки аренавирусами, могут быть более сложными, чем у других РНК-содержащих вирусов с внешней оболочкой, поскольку в вирионах присутствуют полные вирусные РНК, комплементарные РНК S и мРНК для белка N. Хотя прямое секвенирование РНК из вируса свидетельствует о том, что комплементарные последовательности не так многочисленны, как последовательности с вирионной полярностью (в противном случае определение последовательности при секвенировании было бы неоднозначным), реальные относительные количества и биологическое значение РНК, комплементарной сегменту S, неизвестны. Не исключено, что присутствие этой РНК связано с частицами дефектного вируса.

Генетические свойства аренавирусов

В опытах на вирусе Пичинде показана эффективная рекомбинация за счет обмена сегментами L и S [30, 32, 245, 246]. Вирусы дикого типа получали при совместном заражении различными *ts*-мутантами адаптированного к высокой температуре прототипного вируса Пичинде, а также теми же мутантами и *ts*-мутантами другого штамма вируса Пичинде — вируса Пичинде Мунчик [245, 246]. Мутанты удалось разделить на две группы рекомбинации, соответствующие сегментам L и S вирусной РНК [245]. Получены также реассортанты при совместном заражении различными штаммами диких вирусов LCM [129, 204]. Рекомбинация происходит за счет обмена целыми сегментами РНК, а не за счет внутримолекулярной перестройки, что доказано путем анализа потомства вирусов, охарактеризованных с помощью олигонуклеотидного фингерпринтирования РНК (например, вирусов Пичинде и Мунчик или вируса LCM Армстронг и LCM WE) [129, 204, 246]. Хотя при таких совместных заражениях выделены и не все ожидаемые реассортантные варианты, наличие рекомбинантных вирусов позволило соотнести сегменты РНК и генные продукты. Так, в исследованиях происхождения белков N, GPC и L у вирусов, содержащих L-сегмент РНК от вируса Пичинде и S-сегмент от вируса Мунчик,

было обнаружено что РНК L кодирует белок L (200K) вируса Пичинде, а S-сегмент — белки N и GPC вируса Мунчик [114, 246]. Кроме того, и для вируса Пичинде, и для вируса LCM было показано, что в модельных системах на животных вирулентность [119, 246] определяется генными продуктами, кодируемыми S-сегментом.

Есть сообщения о комплементации с участием *ts*-мутантов по генам различных белков, кодируемых сегментом S вируса LCM [204]. Обнаружены три комплементационные группы, причем одна комплементируемая функция кодируется сегментом L и две — сегментом S. И хотя неизвестно, какие мутанты по S-сегменту соответствуют белку GPC, а какие — N, эти данные согласуются с представлением о том, что два генных продукта S-сегмента синтезируются независимо.

При совместном заражении *ts*-мутантами по S-сегменту штаммов LCM ARM и LCM WE [204] обнаружены также диплоидные вирусы. Потомство образует бляшки при непермиссивной температуре и содержит (по данным фингерпринтного анализа) S-сегменты как LCM ARM, так и LCM WE [204]. Тем не менее они дают большое количество *ts*-потомства, т. е. генетически нестабильны. Эти результаты можно понять, предположив совместную упаковку комплементирующих S-сегментов, которые при непермиссивной температуре синтезируют как N-белок, так и белок GPC дикого типа [т. е. белки, представляющие собой продукты генов дикого типа (не *ts*) каждого из сегментов S].

Биологическое значение диплоидности (или полиплоидности) аренавирусов неизвестно. Она может увеличивать генетическую стабильность. В этой связи сообщалось, что *ts*-мутанты аренавирусов трудно индуцировать и выделить [245]. Это может быть также результатом образования полиплоидов, например, если *ts*-мутантная РНК упаковывается вместе с летальной мутантной РНК или РНК дикого типа. Получены данные, свидетельствующие о том, что некоторые *ts*-мутанты по РНК L вируса LCM действуют как мутаторы (т. е. совместное заражение такими мутантами и вирусом дикого типа дает необычно большое количество *ts*-мутантов, включая мутанты по сегменту РНК, отличному от того, в котором содержалась исходная мутация) [11]. Возможно, что мутаторы имеют дефектную РНК-полимеразу, для которой характерна пониженная точность репликации.

При совместном заражении *ts*-мутантами вирусов Пичинде и LCM рекомбинантов не обнаруживается [204]. Ограничена ли в природе способность к рекомбинации между различными аренавирусами, неизвестно. Тогда как *in vitro* [129, 246] межтипные рекомбинанты найдены, для природных условий этот

вопрос остается открытым. Пока для ответа на него исследовано с помощью фингерпринтов недостаточное число полевых изолятов аренавирусов.

Процесс репликации аренавирусов

Выяснены лишь некоторые детали отдельных этапов репликации аренавирусов [199]. Только иногда (в зависимости от вируса и хозяйской клетки) начальный цикл заражения имеет цитолитический характер [199]. В отличие от многих других вирусов аренавирусы не вызывают прекращения синтеза макромолекул хозяйской клетки [48, 80, 105, 212]. Однако в зараженных аренавирусами клетках мышинной нейробластомы снижается синтез медиаторов [170], а в других клетках, зараженных этими вирусами, изменяются антигены гистосовместимости [168, 270].

По сравнению с рабдовирусами инфекционный процесс, вызываемый аренавирусами, более медленный [80, 199]: латентный период составляет $\sim 3-8$ ч [80, 154, 248], тогда как для рабдовируса везикулярного стоматита (VSV) он равен 1 ч. Показано, что время максимальной продукции вируса зависит от температуры инкубации и множественности заражения [1, 48, 84, 138, 140, 248]. При температуре $35-38^\circ\text{C}$ максимальный титр вируса [$(1-5) \cdot 10^8$ БОЕ/мл] достигается через 36 ч после заражения (для VSV выход вируса через 4-6 ч составляет 10^9-10^{10} БОЕ/мл).

Пока нет никаких данных о процессе первичной транскрипции мРНК *in vivo* или о типах и свойствах продуктов (например, мРНК белка N, ее 5'- и 3'-концевых последовательностях). Неизвестно также, что определяет переключение с первичной транскрипции на репликацию РНК и вторичную транскрипцию. Ни 5-бромодезоксиуридин, ни 5-иоддезоксиуридин — ингибиторы синтеза ДНК — не подавляют репликацию вируса Пичинде [186], в то время как цитохалазин В [14], актиномицин D в высоких концентрациях и α -аманитин подавляют этот процесс [61, 154, 196, 225]. Причины подавления репликации аренавирусов актиномицином D и α -аманитином детально не исследовали. Очевидно, первый блокирует поздние стадии репликации аренавирусов и не блокирует начальный синтез внутриклеточных вирусных антигенов [196]. Эти вопросы могут быть исследованы при наличии подходящих зондов, представляющих собой индивидуальные вирусные гены и индивидуальные цепи РНК. Помимо факта почкования аренавирусов от плазматической мембраны клетки о процессе их морфогенеза и созревания, ничего не известно. Вирус Пичинде нуждается в клеточном ядре по крайней мере первые 8 ч после заражения [14].

Персистентная инфекция

Для создания персистентно зараженных линий клеток использовали многие аренавирусы [198]. Такие клеточные линии легко получить [137, 138, 224, 259]. Роль дефектных вирусов в этом процессе неясна [83, 85, 138—141, 224, 259, 260, 262, 263]. Дефектные вирусы обычно образуются как в острой, так и в хронической фазе аренавирусных инфекций, зачастую с образованием новых видов вирусной РНК [83, 85, 105].

Одной из особенностей персистентно зараженных культур является отсутствие (или присутствие в малых количествах) вирусных антигенов на поверхности клеток, несмотря на то, что вирусные белки содержатся в цитоплазме [118, 119, 141, 262]. Неясно, обусловлено ли это тем, что в цитоплазме клеток присутствует белок N и мРНК белка GPC не синтезируется, или тем, что нарушен транспорт гликопротеинов к поверхности клетки. Персистентно зараженные линии клеток устойчивы к продуктивной суперинфекции гомологичным вирусом, но допускают суперинфекцию некоторыми гетерологичными аренавирусами [138, 260]. Уровень, на котором осуществляется подавление суперинфекции (адсорбция, проникновение, транскрипция и т. д.), неизвестен.

Заражение аренавирусами *in vivo*

Аренавирусы имеют очень ограниченный спектр природных хозяев (Cricetidae, включая полевок, песчанок и др., и Muridae, включая мышей, крыс и др.) [126], но многих животных можно заразить ими в опыте. Обычно природные хозяева заражаются вирусами на ранних этапах жизни с последующим развитием у них персистентной инфекции с выделением вируса [125, 198]. Развивающийся при этом хронический гломерулонефрит связан с присутствием комплексов антиген—антитело [52, 169].

Врожденная инфекция или возникшая сразу после рождения обычно характеризуется отсутствием или присутствием в низких концентрациях нейтрализующих антител, виремией и выделением вируса в течение всей жизни в лимфу и мочу [75, 198]. Как считают Роулс и сотр. [198], развитие персистентной инфекции связано с компетентностью и зрелостью иммунной системы. Взрослые животные, подвергающиеся заражению, обычно справляются с виремией и дают заметные титры нейтрализующих антител. При этом важную роль играют комплемент [261] и гуморальный и клеточный иммунные ответы. В модельных системах за летальный исход инфекции при заражении вирусом ответственны изменения, обусловленные взаимодействием между цитотоксическими Т-лимфоцитами и зараженными

вирусом клетками хозяина. Для персистентно зараженных животных характерно очень слабое эффекторное действие Т-лимфоцитов. Причина этого неизвестна. У других аренавирусов, например у вируса Пичинде при заражении им некоторых линий хомячков, мишенью являются ретикулоэндотелиальные клетки различных органов [157].

Механизм острых геморрагических болезней, вызываемых вирусами Хунин и Мачупо, вероятно, иной; в этом случае наблюдается геморрагия многих органов, а также шок, обусловленный уменьшением объема циркулирующей крови [121]. Больничная передача аренавирусов (особенно вируса Ласса) имеет важное значение для здравоохранения как в странах, эндемичных по этому вирусу, так и в тех областях, куда приезжают люди из этих стран.

В заключение нужно отметить, что группа аренавирусов включает возбудителей, которые вызывают не только тяжелые, иногда летальные, заболевания человека, но и персистентные инфекции у грызунов отдельных видов. Полученные к настоящему времени сведения о патогенезе аренавирусных заболеваний и о молекулярной основе возникновения и поддержания персистентной инфекции скудны. Этот вопрос предстоит подробно исследовать в будущем.

Литература

1. Abelson H. T., Smith G. H., Hoffman H. A., Rowe W. P. (1969). Use of enzyme-labeled antibody for electron microscopic localization of lymphocytic choriomeningitis virus antigen in infected cell cultures, *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 497—515.
2. Akashi H., Bishop D. H. L. (1983). Comparison of the sequences and coding of La Crosse and snowshoe hare bunyavirus S RNA species, *J. Virol.*, **45**, 1155—1158.
3. Akashi H., Gay M., Ihara T., Bishop D. H. L. (1984). Localized conserved region of the S RNA gene products of bunyaviruses are revealed by sequence analyses of the Simbu serogroup Aino viruses, *Virus Res.*, **1**, 51—63.
4. Amundson T. E., Yuill T. M. (1981). Natural La Crosse virus infection in the red fox (*Vulpes fulva*), gray fox (*Urocyon cinereoagenteus*), raccoon (*Procyon lotor*) and opossum (*Didelphis virginiana*), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 706—714.
5. Anon M. C., Grau O., Martinez-Segovia Z., Franze-Fernandez M. T. (1976). RNA composition of Junin virus, *J. Virol.*, **18**, 833—838.
6. Armstrong C., Lillie R. D. (1934). Experimental lymphocyte choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic, *Pub. Health Reports*, **49**, 1019—1027.
7. Armstrong C., Sweet L. K. (1939). Lymphocytic choriomeningitis report of two cases with recovery of the virus from gray mice (*Mus musculus*) trapped in the two infected households, *Pub. Health Report*, **54**, 673—684.
8. Auperin D., Compans R. W., Bishop D. H. L. (1982). Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses, *Virology*, **121**, 200—203.
9. Auperin D., Dimock K., Cash P., Rawls W. E., Leung W.-C., Bishop D. H. L.

- (1981). Analyses of the genomes of prototype Pichinde and a virulent derivative of Pichinde Munchique arenaviruses: Evidence for sequence conservation at the 3' termini of their viral RNA species, *Virology*, **116**, 363—367.
10. Auperin D. D., Galinski M., Bishop D. H. L. (1983). The sequences of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenaviruses, *Virology*, **134**, 208—219.
 11. Auperin D. D., Romanowski V., Bishop D. H. L. (1984). Genetic analyses of Pichinde and LCM arenaviruses; evidence for a unique organization for Pichinde S RNA. In: *Segmented Negative Strand Viruses, Arenaviruses, Bunyaviruses and Orthomyxoviruses*, ed. by R. W. Compans and D. H. L. Bishop, pp. 51—73, Academic Press, New York.
 12. Auperin D. D., Romanowski V., Bishop D. H. L. (1984). Novel coding strategy of arenaviruses—An ambisense viral S RNA, *J. Virol.*, **52** (in press).
 13. Balfour H. H., Edelman C. K., Cook F. E., Barton W. I., Buzicky A. W., Siem R. A., Bauer H. (1975). Isolates of California encephalitis (La Crosse) virus from field-collected eggs and larvae of *Aedes triseriatus*: Identification of the overwintering site of California encephalitis, *J. Infect. Dis.*, **131**, 712—716.
 14. Banerjee S. N., Buchmeier M., Rawls W. E. (1976). Requirement of cell nucleus for the replication of an arenavirus, *Intervirology*, **6**, 190—196.
 15. Beaty B. J., Bishop D. H. L., Gay M., Fuller F. (1983). Interference between bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes, *Virology*, **127**, 83—90.
 16. Beaty B. J., Fuller F., Bishop D. H. L. (1983). Bunyavirus gene structure-function relationship and potential for RNA segment reassortment in the vector: La Crosse and snowshoe hare reassortment viruses in mosquitoes. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 123, California Serogroups Viruses, ed. by C. H. Calisher and W. H. Thompson, pp. 119—128.
 17. Beaty B. J., Holterman M., Tabachnick W., Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1981). Molecular basis of bunyavirus transmission by mosquitoes: The role of the M RNA segment, *Science*, **211**, 1433—1435.
 18. Beaty B. J., Miller B. R., Holterman M., Tabachnick W. J., Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1981). Pathogenesis of bunyavirus reassortants in *Aedes triseriatus* mosquitoes. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 153—158, Elsevier, New York.
 19. Beaty B. J., Miller B. R., Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1982). Molecular basis of bunyavirus per os infection of mosquitoes: The role of the M RNA segment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1295—1297.
 20. Beaty B. J., Rozhon E. J., Gensemer P., Bishop D. H. L. (1981). Formation of reassortant bunyaviruses in dually-infected mosquitoes, *Virology*, **111**, 662—665.
 21. Beaty B. J., Shope R. E., Clarke D. H. (1977). Salt-dependent hemagglutination with Bunyaviridae antigens, *J. Clin. Microbiol.*, **5**, 548—550.
 22. Beaty B. J., Thompson W. H. (1975). Emergence of La Crosse virus from endemic foci: Fluorescent antibody studies of overwintered *Aedes triseriatus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24**, 685—691.
 23. Beaty B. J., Thompson W. H. (1976). Delineation of La Crosse virus in developmental stages of transovarially infected *Aedes triseriatus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **25**, 505—512.
 24. Beaty B. J., Thompson W. H. (1977). Tropisms of La Crosse virus in *Aedes triseriatus* following infective blood meals, *J. Med. Entomol.*, **14**, 499—503.
 25. Berge T. O., ed. (1975). *International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates*, U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Publication No. CDC 75—8301.
 26. Berge T. O., Chamberlain R. W., Shope R. E., Work T. H. (1971). The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthro-

- pod-Borne Viruses. Catalogue of arthropod-borne and selected vertebrate viruses of the world, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **20**, 1018—1050.
27. *Berge T. O., Shope R. E., Work T. H.* (1970). The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-Borne Viruses. Catalogue of arthropod-borne viruses of the world, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 1079—1160.
 28. *Berry R. L., Lalonde B. J., Stegmiller H. W., Parsons M. A., Bear G. T.* (1974). Isolation of La Crosse virus (California encephalitis group) from field collected *Aedes triseriatus* (Say) larvae in Ohio (Diptera: Culicidae), *Mosq. News*, **34**, 454—457.
 29. *Bishop D. H. L.* (1979). Genetic analyses of bunyaviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **86**, 1—33.
 30. *Bishop D. H. L.* (1980). Propiedades moleculares y geneticas de los arenavirus, *Medicina* (Buenos Aires), **40**, 275—288.
 31. *Bishop D. H. L.* (1982). The molecular properties of bunyaviruses including group C isolates, and the genetic capabilities of bunyaviruses to form recombinants. In: *International Symposium on Tropical Arboviruses and Hemorrhagic Fevers*, ed. by F. de P. Pinheiro, pp. 117—133, *Impresso Nat. Fund. Sci. Dev. Tech.*, Belem, Brazil.
 32. *Bishop D. H. L., Beaty B. J., Shope R. E.* (1980). Recombination and gene coding assignments of bunyaviruses and arenaviruses, *Ann. NY Acad. Sci.*, **354**, 84—106.
 33. *Bishop D. H. L., Calisher C., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Ya., Hannoun C., Lvov D. K., Marshall I. D., Oker-Blom N., Pettersson R. F., Porterfield J. S., Russell P. K., Shope R. E., Westaway E. G.* (1980). *Bunyaviridae*, *Intervirology*, **14**, 125—143.
 34. *Bishop D. H. L., Clerx J. P. M., Clerx-van Haaster C. M., Robeson G., Rozhon E. J., Ushijima H., Veerisetty V.* (1981). Molecular and genetic properties of members of the *Bunyaviridae*. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 135—145, Elsevier, New York.
 35. *Bishop D. H. L., Fuller F. J., Akashi H.* (1983). Coding assignments of the RNA genome segments of California serogroup viruses. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 123, *California Serogroup Viruses*, ed. by C. H. Calisher and W. H. Thompson, pp. 107—117.
 36. *Bishop D. H. L., Fuller F., Akashi H., Beaty B., Shope R. E.* (1983). The use of reassortant bunyaviruses to deduce their coding and pathogenic potentials. In: *Mechanisms of Viral Pathogenesis: From Gene to Pathogen*, ed. by A. Kohn and P. Fuchs, pp. 49—60, *Martinus Nijhoff*, Boston.
 37. *Bishop D. H. L., Gay M. E., Matsuoko Y.* (1983). Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of the species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6409—6418.
 38. *Bishop D. H. L., Gentsch J. R., El-Said L. H.* (1978). Genetic capabilities of bunyaviruses, *J. Egypt. Pub. Health Assoc.*, **53**, 217—234.
 39. *Bishop D. H. L., Gould K. G., Akashi H., Clerx-van Haaster C. M.* (1982). The complete sequence and coding content of snowshoe hare bunyavirus small (S) viral RNA species, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3703—3713.
 40. *Bishop D. H. L., Rud E., Bellonck S., Akashi H., Ihara T., Matsuoko Y., Eshita Y.* (1984). Sequence and coding analyses of bunyavirus RNA species. In: *Segmented Negative Strand Viruses, Arenaviruses, Bunyaviruses and Orthomyxoviruses*, ed. by R. W. Compans and D. H. L. Bishop, *Academic Press*, New York, pp. 3—11.
 41. *Bishop D. H. L., Shope R. E.* (1979). *Bunyaviridae*. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 14, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 1—156, *Plenum Press*, New York.
 42. *Boersma D. P., Saleh F., Nakamura K., Compans R. W.* (1982). Structure and glycosylation of Tacaribe viral glycoproteins, *Virology*, **123**, 452—456.

43. Bouloy M., Colbere F., Krams-Ozden S., Vialat P., Garapin A. C., Hannon C. (1975). Activité RNA polymerasique associée à un Bunyavirus (Lumbo), C. R. Acad. Sci. Paris, **280D**, 213—215.
44. Bouloy M., Hannoun C. (1973). Effect de l'actinomycine D sur la multiplication du virus Tahyna, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), **124b**, 547—553.
45. Bouloy M., Hannoun C. (1976). Studies on Lumbo virus replication. I. RNA-dependent RNA polymerase associated with virions, Virology, **69**, 258—264.
46. Bouloy M., Hannoun C. (1976). Studies on Lumbo virus replication. II. Properties of viral ribonucleoproteins and characterization of messenger RNAs, Virology, **71**, 363—370.
47. Bouloy M., Krams-Ozden S., Horodniceanu F., Hannoun C. (1973/74). Three segment RNA genome of Lumbo virus (bunyavirus), Intervirology, **2**, 173—180.
48. Buchmeier M. J., Elder J. H., Oldstone M. B. A. (1978). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: Identification of the virus structural and cells associated polypeptides, Virology, **89**, 133—145.
49. Buchmeier M. J., Gee S. R., Rawls W. E. (1977). The antigens of Pichinde virus. I. The relationship of soluble antigens derived from infected BHK-21 cells with structural components of the virion, J. Virol., **22**, 175—186.
50. Buchmeier M. J., Lewicki H. A., Tomori O., Oldstone M. B. A. (1981). Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: Generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses, Virology, **113**, 73—85.
51. Buchmeier M. J., Oldstone M. B. A. (1978). Identity of the viral protein responsible for serological cross reactivity among the Tacaribe complex arenaviruses. In: Negative Strand Viruses and the Host Cell, ed. by B. W. J. Mahy and R. D. Barry, pp. 91—97, Academic Press, New York.
52. Buchmeier M. J., Oldstone M. B. A. (1978). Virus-induced immune complex disease: Identification of specific viral antigens and antibodies deposited in complexes during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection, J. Immunol., **120**, 1297—1304.
53. Buchmeier M. J., Oldstone M. B. A. (1979). Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: Evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides, Virology, **99**, 111—120.
54. Buchmeier M. J., Oldstone M. B. A. (1981). Molecular studies of LCM virus-induced immunopathology: Development and characterization of monoclonal antibodies to LCM virus, In: Replication of Negative Strand Viruses, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 71—78, Elsevier/North-Holland, New York.
55. Buchmeier M. J., Welsh R., Dutko F., Oldstone M. B. A. (1980). The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection, Adv. Immunol., **30**, 275—331.
56. Buckley S. M., Casals J. (1970). Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus, Am. J. Trop. Med. Hyg., **19**, 680—691.
57. Cabradilla C. D., Holloway B. P., Obijeski J. F. (1983). Molecular cloning and sequencing of the La Crosse virus S RNA, Virology, **128**, 463—468.
58. Calisher C. H., Tzianabos T., Lord R. D., Coleman P. H. (1970). Tamiami virus, a new member of the Tacaribe group, Am. J. Trop. Med. Hyg., **19**, 520—526.
59. Carter M. F., Biswal N., Rawls W. E. (1973). Characterization of nucleic acid of Pichinde virus, J. Virol., **11**, 61—68.
60. Carter M. F., Biswal N., Rawls W. E. (1974). Polymerase activity of Pichinde virus, J. Virol., **13**, 577—583.
61. Carter M. F., Murphy F. A., Brunschwig J. P., Noonan C., Rawls W. E. (1973). Effects of actinomycin D and ultraviolet and ionizing radiation on Pichinde virus, J. Virol., **12**, 33—38.

62. *Casals J.* (1975). Arenaviruses, *Yale J. Biol. Med.*, **48**, 115—140.
63. *Casals J., Tignor G. H.* (1981). The Nairovirus genus: Serological relationships, *Intervirology*, **14**, 144—147.
64. *Cash P.* (1982). Inhibition of La Crosse virus replication by monensin, a monovalent ionophore, *J. Gen. Virol.*, **59**, 193—196.
65. *Cash P., Hedershot L., Bishop D. H. L.* (1981). The effects of glycosylation inhibitors on the maturation and intracellular polypeptide synthesis induced by snowshoe hare bunyavirus, *Virology*, **103**, 235—240.
66. *Cash P., Robeson G., Erlich B. J., Bishop D. H. L.* (1981). Biochemical characterization of Rift Valley Fever and other phlebotomus fever group viruses, *Contribut. Epidemiol. Biostat.*, **3**, 1—20.
67. *Cash P., Vezza A. C., Gentsch J. R., Bishop D. H. L.* (1979). Genome complexities of the three mRNA species of snowshoe hare bunyavirus and in vitro translation of S mRNA to viral N polypeptide, *J. Virol.*, **31**, 685—694.
68. *Chinault D. N., Thompson H. A., Gangemi J. D.* (1981). Polypeptide synthesis catalysed by components of Pichinde virus disrupted by detergent, *J. Gen. Virol.*, **55**, 213—217.
69. *Clerx J. P. M., Bishop D. H. L.* (1981). Qalyub virus, a member of the newly proposed *Nairovirus* genus (Bunyaviridae), *Virology*, **108**, 361—372.
70. *Clerx J. P. M., Casals J., Bishop D. H. L.* (1981). Structural characteristics of nairoviruses. (Genus *Nairovirus*, Bunyaviridae), *J. Gen. Virol.*, **35**, 1—13.
71. *Clerx-van Haaster C. M., Akashi H., Auperin D. D., Bishop D. H.* (1982). Nucleotide sequence analyses and predicted coding of bunyavirus genome RNA species, *J. Virol.*, **41**, 119—128.
72. *Clerx-van Haaster C., Bishop D. H. L.* (1980). Analyses of the 3' terminal sequences of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses, *Virology*, **105**, 564—574.
73. *Clerx-van Haaster C. M., Clerx J. P. M., Ushijima H., Akashi H., Fuller F., Bishop D. H. L.* (1982). The 3' terminal RNA sequences of bunyaviruses and nairoviruses (Bunyaviridae). Evidence of end sequence generic differences within the virus family, *J. Gen. Virol.*, **61**, 289—292.
74. *Clewley J., Gentsch J., Bishop D. H. L.* (1977). Three unique viral RNA species of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses, *J. Virol.*, **22**, 459—468.
75. *Cole G. A., Nathanson N.* (1974). Lymphocytic choriomeningitis pathogenesis, *Prog. Med. Virol.*, **18**, 94—110.
76. *Compans R. W., Borsma D. P., Cash P., Clerx J. P. M., Gimenez H. B., Kirk W. E., Peters C. J., Vezza A. C., Bishop D. H. L.* (1981). Molecular and genetic studies of Tacaribe Pichinde, and lymphocytic choriomeningitis viruses. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 31—42, Elsevier, New York.
77. *Darlymple J. M., Peters C. J., Smith J. F., Gentry M. K.* (1981). Antigenic components of Punta Toro virus. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 167—172, Elsevier, New York.
78. *Darlymple J. M., Smith J. F., Harrison S. A., Bishop D. H. L., Usery M. A.* (1982). Immunological and biochemical characterization of phlebotomus fever bunyaviruses. In: *International Symposium on Tropical Arboviruses and Hemorrhagic Fever*, ed. by F. de P. Pinheiro, pp. 67—78, Imprensa Nat. Fund. Sci. Dev. Tech. Belem, Brazil.
79. *Dalton A. J., Rowe W. P., Smith G. H., Wilsnack R. E., Pugh W. E.* (1968). Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Virol.*, **2**, 1465—1478.
80. *Dimock K., Harnish D., Sisson G., Leung W.-C., Rawls W. E.* (1982). Synthesis of viral specific polypeptides and genomic RNA during the replicative cycle of Pichinde virus, *J. Virol.*, **43**, 273—283.
81. *Downs W. G., Andersen C. R., Spence T. H., Aitken G., Greenhall A. H.*

- (1963). Tacaribe virus, a new agent isolated from antibodies bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **12**, 640—646.
82. Dutko F. J., Kennedy S. I. T., Oldstone M. B. A. (1981). Genome structure of lymphocytic choriomeningitis virus: Cohesive complementary termini? In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 43—47, Elsevier/North-Holland, New York.
 83. Dutko F. J., Helfand J., Pfau C. J. (1978). The RNA's of standard and defective interfering Parana virus, *ASM Abstracts* 1978.
 84. Dutko F. J., Pfau C. J. (1978). Arenaviruses defective interfering particles mask the cell-killing potential of standard virus, *J. Gen. Virol.*, **38**, 195—208.
 85. Dutko F. J., Wright E. A., Pfau C. J. (1976). The RNA's defective interfering Pichinde virus, *J. Gen. Virol.*, **31**, 417—427.
 86. Farber F. E., Rawls W. E. (1975). Isolation of ribosome-like structure from Pichinde virus, *J. Gen. Virol.*, **26**, 21—31.
 87. Foulke R. W., Rosato R. R., French G. R. (1981). Structural polypeptides of Hazara virus, *J. Gen. Virol.*, **53**, 169—172.
 88. Frame F. E., Baldwin A. S., Gocke D. J., Troup J. M. (1970). Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 1. Clinical description and pathological findings, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 670—676.
 89. Fuller F., Bhowan A. S., Bishop D. H. L. (1983). Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural proteins, NS_s, are coded by overlapping reading frames in the S RNA, *J. Gen. Virol.*, **64**, 1705—1714.
 90. Fuller F., Bishop D. H. L. (1982). Identification of viral coded non-structural polypeptides in bunyavirus infected cells, *J. Virol.*, **41**, 643—648.
 91. Gajdusek D. C., Goldgaber D., Millard E., Ono S. G. (1982). Bibliography of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (Murine Virus Nephropathy), National Institutes of Health, Bethesda, MD.
 92. Gangemi J. D., Rosato R. R., Connell E. V., Johnson E. M., Eddy G. A. (1978). Structural polypeptides of Machupo virus, *J. Gen. Virol.*, **41**, 183—188.
 93. Gard G. P., Vezza A. C., Bishop D. H. L., Compans R. W. (1977). Structural proteins of Tacaribe and Tamiami virions, *Virology*, **83**, 84—95.
 94. Gauld L. M., Hanson R. P., Thompson W. H., Sinha S. K. (1974). Observations on a natural cycle of La Crosse virus (California group) in Southwestern Wisconsin, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**, 983—992.
 95. Gauld L. W., Yuill T. M., Hanson R. P., Sinha S. K. (1975). Isolation of La Crosse virus (California encephalitis group) from the chipmunk (*Tamias striatus*), an amplifier host, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24**, 999—1005.
 96. Gentsch J., Bishop D. H. L. (1976). Recombination and complementation between temperature-sensitive mutants of the bunyavirus, snowshoe hare virus, *J. Virol.*, **20**, 351—354.
 97. Gentsch J., Bishop D. H. L. (1978). Small viral RNA segment of bunyaviruses codes for viral nucleocapsid protein, *J. Virol.*, **28**, 417—419.
 98. Gentsch J. R., Bishop D. H. L. (1979). M viral RNA segment of bunyaviruses codes for two unique glycoproteins: G1 and G2, *J. Virol.*, **30**, 767—776.
 99. Gentsch J. R., Bishop D. H. L. (1980). The genetic recombination potential of bunyaviruses. In: *Zbl. Bakt. (Suppl. 9), Arboviruses in the Mediterranean Countries*, ed. by J. Vesenjak-Hirjan et al., pp. 81—96, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
 100. Gentsch J., Bishop D. H. L., Obijeski J. F. (1977). The virus particle nucleic acids and proteins of four bunyaviruses, *J. Gen. Virol.*, **34**, 257—268.
 101. Gentsch J., Clewley J. P., Wynne L. R., Bishop D. H. L. (1978). Genetic and molecular studies of bunyaviruses. In: *Negative Strand Viruses and the Host Cell*, ed. by B. W. J. Mahy and R. D. Barry, pp. 61—71, Academic Press, London.

102. Gentsch J. R., Robeson G., Bishop D. H. L. (1979). Recombination between snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses, *J. Virol.*, **31**, 707—717.
103. Gentsch J. R., Rozhon E. J., Klimas R. A., El Said L. H., Shore R. E., Bishop D. H. L. (1980). Evidence from recombinant bunyavirus studies that the M RNA gene products elicit neutralizing antibodies, *Virology*, **102**, 190—204.
104. Gentsch J. R., Wynne L. R., Clewley J. P., Shope R. E., Bishop D. H. L. (1977). Formation of recombinants between snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses, *J. Virol.*, **24**, 893—902.
105. Gimenez H. B., Compans R. W. (1980). Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells, *Virology*, **107**, 229—239.
106. Gonzalez J. P., McCormick J. B., Saluzzo J. F., Herve J. P., Georges A. J., Johnson K. M. (1983). An arenavirus isolated from wild-caught rodents (*Praomys* species) in the Central African Republic, *Intervirology*, **19**, 105—112.
107. Gonzalez-Scarano F., Shope R. E., Calisher C. E., Nathanson N. (1982). Characterization of monoclonal antibodies against the G1 and N proteins of La Crosse and Tahyna, 2 California serogroup bunyaviruses, *Virology*, **120**, 42—53.
108. Grady L. J., Sanders M. L., Campbell W. P. (1983). Evidence for three separate antigenic sites on the G1 protein of La Crosse virus, *Virology*, **126**, 395—397.
109. Grau O., Franze-Fernandez M. T., Romanowski V., Rustici S. M., Rosas M. F. (1981). Junin virus structure. In: *The Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 11—14, Elsevier, New York.
110. Grimstad P. R., Craig G. B., Ross Q. E., Yuill T. M. (1977). *Aedes triseriatus* and La Crosse virus: Geographic variation in vector susceptibility and ability to transmit, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **26**, 990—996.
111. Grimstad P. R., Ross Q. E., Craig G. B. (1980). *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. 2. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection, *J. Med. Entomol.*, **17**, 1—7.
112. Gschwender H. H., Brummund M., Lehmann-Grube F. (1975). Lymphocytic choriomeningitis virus. I. Concentration and purification of the infectious virus, *J. Virol.*, **15**, 1317—1322.
113. Gundersen C. B., Brown K. L. (1983). Clinical aspects of La Crosse encephalitis: Preliminary report. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 123, California Serogroup Viruses, ed. by C. H. Calisher and W. H. Thompson, pp. 169—177.
114. Harnish D. G., Dimock K., Bishop D. H. L., Rawls W. E. (1983). Gene mapping in Pichinde virus: Assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs, *J. Virol.*, **46**, 638—641.
115. Harnish D., Dimock K., Leung W.-C., Rawls W. (1981). Immunoprecipitable polypeptides in Pichinde virus infected BHK-21 cells. In: *The Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 23—29, Elsevier, New York.
116. Harnish D. G., Leung W.-C., Rawls W. E. (1981). Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus-infected BHK21 cells, *J. Virol.*, **38**, 840—848.
117. Hewlett M. J., Pettersson R. F., Baltimore D. (1977). Circular forms of Uukuniemi virion RNA: An electron microscopic study, *J. Virol.*, **21**, 1085—1093.
118. Hotchin J. (1974). The role of transient infection in arenavirus persistence, *Prog. Med. Virol.*, **18**, 81—93.
119. Hotchin J., Kinch W., Benson L., Sirkova E. (1975). Role of substrains in persistent lymphocytic choriomeningitis virus infection, *Bull. WHO*, **52**, 457—463.
120. Howard C. R., Buchmeier M. J. (1983). A protein kinase activity in lympho-

- cytic choriomeningitis virus and identification of the phosphorylated product using monoclonal antibody, *Virology*, **126**, 538—547.
121. Howard C. R., Simpson D. I. (1980). The biology of arenaviruses, *J. Gen. Virol.*, **51**, 1—14.
 122. Ihara T., Akashi H., Bishop D. H. L. (1984). Novel coding strategy (ambisense genomic RNA) revealed by sequence analyses of Punta Toro phlebovirus S RNA, *Virology*, **136**, 293—306.
 123. Iroegbu C. U., Pringle C. R. (1981). Genetic interactions among viruses of the Buniamwera complex, *J. Virol.*, **37**, 383—394.
 124. Iroegbu C. U., Pringle C. R. (1981). Genetics of the Bunyamwera complex. In: *The Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D; H. D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 159—165, Elsevier, New York.
 125. Johnson K. M., Kuns M. L., Mackenzie R. B., Webb P. A., Yunker C. E. (1966). Isolation of Machupo virus from wild rodent *Calomys callosus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **15**, 103—106.
 126. Johnson K. M., Webb P. A., Justines G. (1973). Biology of Tacaribe complex viruses. In: *Lymphocytic Choriomeningitis and Other Arenaviruses*, ed. by F. Lehmann-Grube, pp. 241—258, Springer Verlag, New York.
 127. Karabatsos N., ed. (1978). Supplement to International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**, 372—373.
 128. Kiley M. P., Tomori O., Regnery R. L., Johnson K. M. (1981). Characterization of the arenaviruses Lassa and Mozambique. In: *The Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 1—9, Elsevier, New York.
 129. Kirk W. E., Cash P., Peters C. J., Bishop D. H. L. (1980). Formation and characterization of an intertypic lymphocytic choriomeningitis recombinant virus, *J. Gen. Virol.*, **51**, 213—218.
 130. Kitamura T., Morita C., Komatsu T., Sugiyama K., Arikawa J., Shiga S., Takeda H., Akao Y., Imaizuma K., Oya A., Hashimoto N., Urasawa S. (1983). Isolation of virus causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) through a cell culture system, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **36**, 17—25.
 131. Klimas R. A., Thompson W. H., Calisher C. H., Clark G. G., Grimstad P. R., Bishop D. H. L. (1981). Genotypic varieties of La Crosse virus isolated from different geographic regions of the continental United States and evidence for a naturally occurring intertypic recombinant La Crosse virus, *Am. J. Epidemiol.*, **114**, 112—131.
 132. Klimas R. A., Ushijima H., Clerx-van Haaster C. M., Bishop D. H. L. (1981). Radioimmune assays and molecular studies that place Anopheles B and Turlock serogroup viruses in the *Bunyavirus* genus (Bunyaviridae), *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 876—887.
 133. Krug R. M., Plotch S. J., Tomasz J. (1978). Influenza viral RNA transcription in vivo and in vitro. In: *Negative Strand Viruses and the Host Cell*, ed. by B. W. J. Mahy and R. D. Barry, pp. 301—311, Academic Press, New York.
 134. LeDuc J. W., Smith G. A., Bagley L. R., Hasty S. E., Johnson K. M. (1982). Preliminary evidence that Hantaan or a closely related virus is enzootic in domestic rodents, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 624.
 135. Lee H. W., Baech L. J., Johnson K. M. (1982). Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, *J. Infect. Dis.*, **146**, 645—651.
 136. Lee H. W., Lee P. W., Johnson K. M. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, *J. Infect. Dis.*, **137**, 298—308.
 137. Lehmann-Grube F. (1967). A carrier state of lymphocytic choriomeningitis virus in L cell cultures, *Nature*, **213**, 770—773.
 138. Lehmann-Grube F. (1971). Lymphocytic choriomeningitis virus, *Virol. Monogr.*, **10**, 1—173.
 139. Lehman-Grube F., Peralta L. M., Bruns M., Lohler J. (1983). Persistent in-

- fection of mice with the lymphocytic choriomeningitis virus. In: Comprehensive Virology, Vol. 18, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 43—103, Plenum Press, New York.
140. Lehman-Grube F., Popescu M., Schaefer H., Gschwender H. H. (1975). LCM virus infection of cells in vitro, Bull. WHO, 52, 443—456.
 141. Lehman-Grube F., Slenczka W., Tees R. (1969). A persistent and inapparent infection of L cells with the virus of lymphocytic choriomeningitis, J. Gen. Virol., 5, 63—81.
 142. Lepine R. P., Molldret P., Kreis B. (1937). Réceptivité de l'homme au virus murin de la choriomeningite lymphocytaire. Reproduction expérimentale de la méningite lymphocytaire bénigne, C. R. Acad. Sci. Paris, 240, 1846—1850.
 143. Leung W.-C., Ghosh H. P., Rawls W. E. (1977). Strandedness of Pichinde virus RNA, J. Virol., 22, 235—237.
 144. Leung W.-C., Harnish D., Ramsingh A., Dimock K., Rawls W. E. (1981). Gene mapping in Pichinde virus. In: The Replication of Negative Strand Viruses, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Comrans, pp. 51—57, Elsevier, New York.
 145. Leung W.-C., Leung M. F. K. L., Rawls W. E. (1979). Distinctive RNA transcriptase, polyadenylic acid polymerase, and polyuridylic acid polymerase activities associated with Pichinde virus, J. Virol., 30, 98—107.
 146. Leung W.-C., Ramsingh A., Dimock K., Rawls W. E., Petrovich J., Leung M. (1981). Pichinde virus L RNA and S RNA contain unique sequences, J. Virol., 37, 48—54.
 147. Leung W.-C., Rawls W. E. (1977). Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus, Virology, 81, 174—176.
 148. Lisitz A. M., DeFoliart G. R., Yuill T. M., Karandinos M. G. (1977). Prevalence rates of La Crosse virus (California encephalitis group) in larvae from overwintered eggs of *Aedes triseriatus*, Mosq. News, 37, 745—750.
 149. Madoff D. H., Lenard J. (1982). A membrane glycoprotein that accumulates intracellularly: Cellular processing of the large glycoprotein of La Crosse virus, Cell, 28, 821—829.
 150. Mannweiler K., Lehmann-Grube F. (1973). Electron microscopy of LCM virus infected L cells, In: Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses, ed. by F. Lehmann-Grube, pp. 37—48, Springer, Berlin.
 151. Martinez-Segovia Z., de Mitri M. I. (1977). Junin virus structural proteins, J. Virol., 21, 579—583.
 152. McCormick J. G., Palmer E. L., Sasso D. R., Kiley M. P. (1982). Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of Bunyaviridae, Lancet, 1, 765—768.
 153. Mettler N. E., Casals J., Shope R. E. (1963). Study of the antigenic relationships between Junin virus, the etiological agent of Argentinian hemorrhagic fever, and other arthropodborne viruses, Am. J. Trop. Med. Hyg., 12, 647—652.
 154. Mifune K., Carter M. F., Rawls W. E. (1971). Characterization studies of the Pichinde virus. A member of the arenavirus group, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 637—644.
 155. Miller B. R., DeFoliart G. R., Yuill T. M. (1977). Vertical transmission of La Crosse virus (California encephalitis group): Transovarial and filial infection rates in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae), J. Med. Entomol., 14, 437—440.
 156. Miller B. R., DeFoliart G. R., Yuill T. M. (1979). *Aedes triseriatus* and La Crosse virus: Lack of infection in eggs of the 1st ovarian cycle following oral infection of females, Am. J. Trop. Med. Hyg., 28, 897—901.
 157. Murphy F. A., Buchmeier M. J., Rawls W. E. (1977). The reticuloendothelium as the target in a virus infection: Pichinde virus pathogenesis in two strains of hamsters, Lab. Invest., 37, 502—515.

158. *Murphy F. A., Webb P. A., Johnson K. M., Whitfield S. G.* (1969). Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: Basis for a new taxonomic group, *J. Virol.*, **4**, 535—541.
159. *Murphy F. A., Webb P. A., Johnson K. M., Whitfield S. G., Chappell W. A.* (1970). Arenaviruses in Vero cells: Ultrastructural studies, *J. Virol.*, **6**, 507—518.
160. *Murphy F. A., Whitfield S. G.* (1975). Morphology and morphogenesis of arenaviruses, *Bull. WHO*, **52**, 407—419.
161. *Murphy F. A., Whitfield S. G., Coleman P. H., Calisher C. H., Rabin E. R., Jensen A. B., Melnick J. L., Edwards M. R., Whitney E.* (1968). California group arboviruses: Electron microscopic studies, *Exp. Mol. Pathol.*, **9**, 44—56.
162. *Obijeski J. F., Bishop D. H. L., Murphy F. A., Palmer E. L.* (1976). Structural proteins of La Crosse Virus, *J. Virol.*, **19**, 985—997.
163. *Obijeski J. F., Bishop D. H. L., Palmer E. L., Murphy F. A.* (1976). Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus, *J. Virol.*, **20**, 664—675.
164. *Obijeski J. F., McCauley J., Skehel J. J.* (1980). Nucleotide sequences at the termini of La Crosse virus RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2431—2438.
165. *Obijeski J. F., Murphy F. A.* (1977). Bunyaviridae: Recent biochemical developments, *J. Gen. Virol.*, **37**, 1—14.
166. *Ofofile A., Pandos M., Molomot N., Duffy J. L.* (1973). Morphological and biological characteristics of the M—P strain of lymphocytic choriomeningitis virus, *Infect. Immun.*, **7**, 309—315.
167. *Oker-Blom N., Salminen A., Brummer-Korvenkontio M., Kaariainen L., Weckstrom P.* (1964). Isolation of some viruses other than typical tick-borne encephalitis viruses from *Ixodes ricinus* ticks in Finland, *Ann. Med. Exp. Fenn.*, **42**, 100—112.
168. *Oldstone M. B. A.* (1975). Relationship between major histocompatibility antigens and disease. Possible associations with human arenavirus disease, *Bull. WHO*, **52**, 479.
169. *Oldstone M. B. A., Dixon F. J.* (1969). Pathogenesis of chronic disease associated with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. I. Relationship of antibody production to disease in neonatally infected mice, *J. Exp. Med.*, **129**, 483—505.
170. *Oldstone M. B. A., Holmstoen J., Welsh R. M., Jr.* (1977). Alterations of acetylcholine enzymes in neuroblastoma cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Cell Physiol.*, **91**, 459—472.
171. *Palmer E. L., Obijeski J. F., Webb P. A., Johnson K. M.* (1977). The circular segmented nucleocapsid of an arenavirus-Tacaribe virus, *J. Gen. Virol.*, **36**, 541—545.
172. *Pantuwatana S., Thompson W. H., Watts D. M., Hanson R. P.* (1972). Experimental infection of chirmunks and squirrels with La Crosse and trivittatus viruses and biological transmission of La Crosse by *Aedes triseriatus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **21**, 476—481.
173. *Pantuwatana S., Thompson W. H., Watts D. M., Yuill T. M., Hanson R. P.* (1974). Isolation of La Crosse virus from field collected *Aedes triseriatus* larvae, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**, 246—250.
174. *Parker M. D., Hawlett M. J.* (1981). The 3'-terminal sequences of Uukuniemi and Inkoo virus RNA genome segments. In: *The Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 125—145, Elsevier, New York.
175. *Parodi A. J., Greenway D. J., Rugiero H. R., Rivers S., Figerio M., De la Barrera J. M., Mittler N., Garzon F., Boxaca M., de Guerrero L., Nota N.* (1958). Sorbe la etiologia del brote epidemico de Junin, *El Dia Medico*, **30**, 2300—2302.
176. *Pedersen I. R.* (1970). Density gradient centrifugation studies on lymphocytic choriomeningitis virus and on viral ribonucleic acid, *J. Virol.*, **6**, 414—420.

177. Pedersen I. R. (1971). Lymphocytic choriomeningitis virus RNAs, *Nature*, **234**, 112—114.
178. Pedersen I. R. (1973). LCM virus: Its purification and its chemical and physical properties. In: *Lymphocytic Choriomeningitis and Other Arenaviruses*, ed. by F. Lehmann-Grube, pp. 13—24, Springer-Verlag, New York.
179. Pedersen I. R. (1979). Structural components and replication of arenaviruses, *Adv. Virus Res.*, **24**, 277—330.
180. Pedersen I. R., Konigshofer E. R. (1976). Characterization of ribonucleoproteins and ribosomes isolated from lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Virol.*, **20**, 14—21.
181. Pesonen M., Kuusimäki E., Pettersson R. F. (1982). Monosaccharide sequence of protein-bound glycans of Uukuniemi virus, *J. Virol.*, **41**, 390—400.
182. Pettersson R. F., Hewlett M. J., Baltimore D., Coffin J. M. (1977). The genome of Uukuniemi virus consists of three unique RNA segments, *Cell*, **11**, 51—63.
183. Pettersson R., Kaariainen L. (1973). The ribonucleic acid of Uukuniemi virus, a noncubical tick-borne arbovirus, *Virology*, **56**, 608—619.
184. Pettersson R., Kaariainen L., von Bonsdorff C.-H., Oker-Blom N. (1971). Structural components of Uukuniemi virus, a non-cubical tick-borne arbovirus, *Virology*, **46**, 721—729.
185. Pettersson R., von Bonsdorff C.-H. (1975). Ribonucleoproteins of Uukuniemi virus are circular, *J. Virol.*, **15**, 386—392.
186. Pfau C. J. (1974). Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses, *Prog. Med. Virol.*, **18**, 64—80.
187. Pfau C. J., Bergold G. H., Casals J., Johnson K. M., Murphy F. A., Pedersen I. R., Rawls W. E., Rowe W. P., Webb P. A., Weissenbacher M. C. (1974). Arenaviruses, *Intervirology*, **4**, 207—213.
188. Pinheiro F. P., Shope R. E., de Andrade A. H. P., Bensabath G., Cacios G. V., Casals J. (1966). Amapari, a new virus of the Tacaribe group from rodents and mites of Amapa territory, Brazil, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 531—535.
189. Pinheiro F. P., Woodall J. P., Travassos Da Rosa A. P. A., Travassos Da Rosa J. F. (1977). Studies of arenaviruses in Brazil, *Medicina (Buenos Aires)*, **37**, 175—181.
190. Porterfield J. S., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Y., Hannoun C., Holmes I. H., Horzinek M. C., Mussgay M., Oker-Blum N., Russell P. K. (1975/76). Bunyaviruses and Bunyaviridae, *Intervirology*, **6**, 13—24.
191. Porterfield J. S., Casals J., Chumakov M. P., Gaidamovich S. Y., Hannoun C., Holmes I. H., Horzinek M. C., Mussgay M., Russell P. K. (1973/74). Bunyaviruses and Bunyaviridae, *Intervirology*, **2**, 270—272.
192. Pringle C. R., Iroegbu C. U. (1982). A mutant identifying a third recombination group in a bunyavirus, *J. Virol.*, **42**, 873—879.
193. Ramos B. A., Courtney R. J., Rawls W. E. (1972). Structural proteins of Pichinde virus, *J. Virol.*, **10**, 661—667.
194. Ramsingh A. I., Dimock K., Rawls W. E., Leung W.-C. (1980). Size estimation of Pichinde virus RNA by gel electrophoresis under denaturing conditions, *Intervirology*, **14**, 31—36.
195. Ranki M., Pettersson R. (1975). Uukuniemi virus contains an RNA polymerase, *J. Virol.*, **16**, 1420—1425.
196. Rawls W. E., Banerjee S. N., McMillan C. A., Buchmeier M. J. (1976). Inhibition of Pichinde virus replication by actinomycin D, *J. Gen. Virol.*, **33**, 421—434.
197. Rawls W. E., Buchmeier M. (1975). Arenaviruses: Purification and physicochemical nature, *Bull. WHO*, **52**, 393—401.
198. Rawls W. E., Chan M. A., Gee S. R. (1981). Mechanisms of persistence in arenavirus infections: A brief review, *Can. J. Microbiol.*, **27**, 568—574.
199. Rawls W. E., Leung W.-C. (1979). Arenaviruses. In: *Comprehensive Virology*

- gy, Vol. 14, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 157—192, Plenum, New York.
200. *Renkonen O., Kaariainen L., Pettersson R., Oker-Blom N.* (1973). The phospholipid composition of Uukuiemi virus, a non-cubical tick-borne arbovirus, *Virology*, **50**, 899—901.
201. *Rice R. M., Erlick B. J., Rosato R. R., Eddy G. A., Mohanty S. B.* (1980). Biochemical characterization of Rift Valley fever virus, *Virology*, **105**, 256—260.
202. *Rivers T. M., Scott T. F. M.* (1935). Meningitis in man caused by a filterable virus, **81**, 439—440.
203. *Robeson G., El Said L. H., Brandt W., Dalrymple J., Bishop D. H. L.* (1979). Biochemical studies on the Phlebotomus fever group viruses (Bunyaviridae family), *J. Virol.*, **30**, 339—350.
204. *Romanowski V., Bishop D. H. L.* (1983). The formation of arenaviruses that are genetically diploid, *Virology*, **126**, 87—95.
205. *Rowe W. P., Murphy F. A., Bergold G. H., Casals J., Hotchin J., Johnson K. M., Lehmann-Grube F., Mims C. A., Traub E., Webb P. A.* (1970). Arenaviruses: Proposed name for a newly defined virus group, *J. Virol.*, **5**, 651—652.
206. *Rowe W. P., Pugh W. F., Webb P. A., Peters C. J.* (1970). Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Virol.*, **5**, 289—292.
207. *Rozhon E. J., Gensemer P., Shope R. E., Bishop D. H. L.* (1981). Attenuation of virulence of a bunyavirus involving an L RNA defect and isolation of LAC/SSH/LAC and LAC/SSH/SSH reassortants, *Virology*, **111**, 125—138.
208. *Said L. H. E., Vorndam V., Gentsch J. R., Clewley J. P., Galisher C. H., Klimas R. A., Thompson W. H., Grayson M., Trent D. W., Bishop D. H. L.* (1979). A comparison of La Crosse virus isolates obtained from different ecological niches and an analysis of the structural components of California encephalitis serogroup viruses and other bunyaviruses, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**, 364—386.
209. *Saikka P., Brummer-Korvenkontio M.* (1973). Arboviruses in Finland. II. Isolation and characterization of Uukuniemi virus, a virus associated with ticks and birds, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **22**, 390—399.
210. *Saikka P., von Bonsdorff C.-H.* (1968). Electron microscopy of the Uukuniemi virus, an ungrouped arbovirus, *Virology*, **34**, 804—806.
211. *Saikka P., von Bonsdorff C.-H., Oker-Blom N.* (1970). The structure of Uukuniemi virus, *Acta Virol.*, **14**, 103—107.
212. *Saleh F., Gard G. P., Compans R. W.* (1979). Synthesis of Tacaribe viral proteins, *Virology*, **93**, 369—376.
213. *Samso A., Bouloy M., Hannoun C.* (1975). Présence de ribonucléoprotéines circulaires dans le virus Lumbo (Bunyavirus), *C. R. Acad. Sci. Paris D*, **280**, 779—782.
214. *Samso A., Bouloy M., Hannoun C.* (1976). Mise en évidence de molécules d'acide ribonucléique circulaire dans le virus Lumbo (Bunyavirus), *C. R. Acad. Sci. Paris D*, **282**, 1653—1655.
215. *Schmaljohn C. S., Dalrymple J. M.* (1983). Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence for a new genus of Bunyaviridae, **131**, 482—491.
216. *Schmaljohn C. S., Dalrymple J. M.* (1984). Biochemical characterization of Hantaan virus, In: *Segmented Negative Strand Viruses, Arenaviruses, Bunyaviruses and Orthomyxoviruses*, ed. by R. W. Compans and D. H. L. Bishop, pp. 117—124, Academic Press, New York.
217. *Schmaljohn C. S., Hasty S. E., Harrison S. A., Dalrymple J. M.* (1983). Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome, *J. Infect. Dis.*, **148**, 1005—1012.
218. *Seymour C., Amundson T. E., Yuill T. M., Bishop D. H. L.* (1983). Experimental infection of chipmunks and snowshoe hares with La Crosse and

- snowshoe hare viruses and four of their reassortants, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**, 1147—1153.
219. Shope R. E., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1981). Role of the middle-sized bunyavirus RNA segment in mouse virulence, *Virology*, **114**, 273—276.
 220. Shope R. E., Tignor G. H., Jacoby R. O., Watson H., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1982). Pathogenicity analyses of reassortant bunyaviruses: Coding assignments. In: International Symposium on Tropical Arboviruses and Hemorrhagic Fever, ed. by F. de P. Pinheiro, pp. 135—146, Impresso Nat. Fund. Sci. Dev. Tech. Belem, Brazil.
 221. Shope R. E., Tignor G. H., Rozhon E. J., Bishop D. H. L. (1981). The association of the bunyavirus middle-sized RNA segment with mouse pathogenicity. In: Replication of Negative Strand Viruses, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 146—152, Elsevier, New York.
 222. Smith J. F., Pifat D. Y. (1982). Morphogenesis of sandfly viruses (Bunyaviridae family), *Virology*, **121**, 61—81.
 223. Speir R. W., Wood D., Liebhaber H., Buckley S. M. (1970). Lassa fever: A new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 692—694.
 224. Staneck L. D., Trowbridge R. S., Welsh R. M., Wright E. A., Pfau C. J. (1972). Arenaviruses: Cellular response to long term in vitro infection with Parana and LCM viruses, *Infect. Immun.*, **6**, 444—450.
 225. Stanwick T. L., Kirk B. E. (1976). Analysis of baby hamster kidney cells persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Gen. Virol.*, **32**, 361—367.
 226. Struthers J. K., Swanepoel R. (1983). Identification of a major non-structural protein of the nuclei of Rift Valley fever virus-infected cells, *J. Gen. Virol.*, **60**, 361—384.
 227. Swanepoel R., Blackburn M. K. (1977). Demonstration of nuclear immunofluorescence in Rift Valley fever infected cells, *J. Gen. Virol.*, **34**, 557—561.
 228. Taylor R. M. (1967). Catalogue of Arthropod-Borne Viruses of the World, Public Health Service Pub. No. 1760, U. S. Government Printing Office, Washington, DC.
 229. Tech R. E., Chaniotis B. N., Peralta P. H., Johnson K. M. (1974). Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**, 258—269.
 230. Tesh R. B., Peters C. J., Meegan J. M. (1982). Studies on the antigenic relationship among phleboviruses, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**, 149—155.
 231. Thompson W. H. (1979). Higher venereal infection and transmission rates with La Crosse virus in *Aedes triseriatus* engorged before mating, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**, 890—896.
 232. Thompson W. H., Anslow R. O., Hanson R. P., DeFoliart G. R. (1972). La Crosse virus isolations from mosquitoes in Wisconsin, 1964—68, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **21**, 90—96.
 233. Thompson W. H., Beaty B. J. (1977). Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes, *Science*, **196**, 530—531.
 234. Thompson W. H., Beaty B. J. (1978). Venereal transmission of La Crosse virus from male to female *Aedes triseriatus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **27**, 187—196.
 235. Thompson W. H., Engeseth D. J., Jackson J. O., DeFoliart G. R., Hanson R. P. (1967). California encephalitis group virus infections in small mammals and insects in a deciduous forest area of southwestern Wisconsin, *Bull. Wildl. Dis. Assoc.*, **3**, 92.
 236. Thompson W. H., Evans A. O. (1965). California encephalitis virus studies in Wisconsin, *Am. J. Epidemiol.*, **81**, 230—244.

237. *Thompson W. H., Kalfayan B., Anslow R. O.* (1965). Isolation of California encephalitis group virus from a fatal human illness, *Am. J. Epidemiol.*, **81**, 245—253.
238. *Tignor G. H., Burrage T. C., Smith A. L., Shope R. E.* (1983). California serogroup gene structure-function relationships: Virulence and tissue tropisms. In: *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 123, California Serogroup Viruses, ed. by C. H. Calisher and W. H. Thompson, pp. 129—138.
239. *Trapido H., Sanmartin C.* (1971). Pichinde virus: A new virus of the Tacaribe group from Colombia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **20**, 631—641.
240. *Travassos Da Rosa A. P. A., Tesh R. B., Pinheiro F. P., Travassos Da Rosa J. F. S., Peterson N. E.* (1983). Characterization of eight new phlebotomus fever serogroup arboviruses (Bunyaviridae: *Phlebovirus*) from the Amazon region of Brazil, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**, 1164—1171.
241. *Tsai T. F., Bauer S. P., Sasso D. R., McCormick J. B., Bradford H., Caraway C. T., McFarland L. M., Medrand O., Soulie G.* (1982). Preliminary evidence that Hantaan or a closely related virus is enzootic in domestic rodents, *N. Engl. J. Med.*, **307**, 623—624.
242. *Ulmänen I., Paivi S., Petterson R. F.* (1981). In vitro translation of Uukuniemi virus-specific RNA: Identification of a nonstructural protein and a precursor to the membrane glycoproteins, *J. Virol.*, **37**, 72—79.
243. *Ushijima H., Clerx-van Haaster C. M., Bishop D. H. L.* (1981). Analyses of Patois group bunyaviruses: Evidence for naturally occurring recombinant bunyaviruses and existence of viral coded nonstructural proteins induced in bunyavirus infected cells, *Virology*, **110**, 318—332.
244. *Ushijima H., Klimas R., Kim S., Cash P., Bishop D. H. L.* (1980). Characterization of the viral ribonucleic acids and structural polypeptides of Anopheles A, Bunyamwera, Group C, California, Capim, Guama, Patois, and Simbu bunyaviruses, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1441—1452.
245. *Veza A. C., Bishop D. H. L.* (1977). Recombination between temperature sensitive mutants of the arenavirus, Pichinde, *J. Virol.*, **24**, 712—715.
246. *Veza A. C., Cash P., Jahrling P., Eddy G., Bishop D. H. L.* (1980). Arenavirus recombination: The formation of recombinants between prototype pichinde and Pichinde Munchie viruses and evidence that arenavirus S RNA codes for N polypeptide, *Virology*, **106**, 250—260.
247. *Veza A. C., Clewley J. P., Gard G. P., Abraham N. Z., Compans R. W., Bishop D. H. L.* (1978). Viron RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe, and Tamiami, *J. Virol.*, **26**, 485—497.
248. *Veza A. C., Gard G. P., Compans R. W., Bishop D. H. L.* (1977). Structural components of the arenavirus Pichinde, *J. Virol.*, **23**, 776—786.
249. *Veza A. C., Repik P. M., Cash P., Bishop D. H. L.* (1979). In vivo transcription and protein synthesis capabilities of bunyaviruses: Wild-type snowshoe hare virus and its temperature-sensitive Group I, Group II and Group I/II mutants, *J. Virol.*, **31**, 426—436.
250. *von Bonsdorff C.-H., Pettersson R.* (1975). Surface structure of Uukuniemi virus, *J. Virol.*, **16**, 1296—1307.
251. *von Bonsdorff C.-H., Saikku P., Oker-Blom N.* (1969). The inner structure of Uukuniemi virus and two Bunyamwera supergroup arboviruses, *Virology*, **39**, 342—344.
252. *von Bonsdorff C.-H., Saikku P., Oker-Blom N.* (1970). Electron microscope study on the development of Uukuniemi virus, *Acta Virol.*, **14**, 109—114.
253. *Vorndam A. V., Trent D. W.* (1979). Oligosaccharides of the California encephalitis viruses, *Virology*, **95**, 1—7.
254. *Watts D. M., Grimstad P. R., DeFoliart G. R., Yuill T. M., Hanson R. P.* (1973). Laboratory transmission of La Crosse encephalitis virus by several species of mosquitoes, *J. Med. Entomol.*, **10**, 583—586.
255. *Watts D. M., Morris C. D., Wright R. E., DeFoliart G. R., Hanson R. P.*

- (1972). Transmission of La Crosse virus (California encephalitis group) by the mosquito *Aedes triseriatus*, J. Med. Entomol., **9**, 125—127.
256. Watts D. M., Pantuwatana S., DeFoliart G. R., Yuill T. M., Thompson W. H. (1973). Transovarial transmission of La Crosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*, Science, **182**, 1140—1141.
 257. Watts D. M., Thompson W. H., Yuill T. M., DeFoliart G. R., Hanson R. P. (1974). Over-wintering of La Crosse virus in *Aedes triseriatus*, Am. J. Trop. Med. Hyg., **23**, 694—700.
 258. Webb P. A., Johnson K. M., Hibbs J. B., Kuns M. L. (1970). Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay, Archiv Ges. Virusforsch., **32**, 379—388.
 259. Welsh R. M., Buchmeier M. J. (1979). Protein analysis of defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus and persistently infected cells, Virology, **96**, 503—515.
 260. Welsh R. M., Burner P. A., Holland J. J., Oldstone M. B. A., Thompson H. A., Villarreal L. P. (1975). A comparison of biochemical and biological properties of standart and defective lymphocytic choriomeningitis viruses, Bull. WHO, **52**, 403—408.
 261. Welsh R. M., Lampert P. W., Burner P. A., Oldstone M. B. A. (1976). Antibody-component interactions with purified lymphocytic choriomeningitis virus, Virology, **73**, 59—71.
 262. Welsh R. M., Oldstone M. B. A. (1977). Inhibition of immunologic injury of cultured cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: Role of defective interfering virus in regulating viral antigen expression, J. Exp. Med., **145**, 1449—1468.
 263. Welsh R. M., Pfau C. J. (1972). Determinants of lymphocytic choriomeningitis interference, J. Gen. Virol., **14**, 177—187.
 264. White J. D., Shirey F. G., French G. R., Huggins J. W., Brand O. M. (1982). Hantaan virus, aetiological agent of Korean haemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology, Lancet, **1**, 768—771.
 265. WHO Regional Office for the Western Pacific (1982). Report of the Working Group on Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome, February, 1982, Tokyo, WPR/RPD/WG/82.16.
 266. Wright R. E., Anslow R. W., Thompson W. H., DeFoliart G. R., Seawright G., Hanson R. P. (1970). Isolation of La Crosse virus of the California group from Tabanidae in Wisconsin, Mosq. News, **30**, 600—603.
 267. Wulff H., McIntosh B. M., Hammer D. B., Johnson K. M. (1977). Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in South-east Africa, Bull. WHO, **55**, 441—444.
 268. Young P. R., Chanas A. C., Howard C. R. (1981). Analysis of the structure and function of Pichinde virus polypeptides. In: Replication of Negative Strand Viruses, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 15—22, Elsevier, New York.
 269. Young P. R., Howard C. R. (1983). Fine Structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids, J. Gen. Virol., **64**, 833—842.
 270. Zinkernagel R. M., Doherty P. C. (1977). Major transplantation antigens, viruses, and specificity of surveillance T cells, Contemp. Top. Immunobiol., **7**, 179.

Рабдовирусы*Сьюзен У. Эмерсон¹*

На сегодня к рабдовирусам условно относят более 60 вирусов [19]. Главным критерием их классификации служит морфология: «рабдо» означает «палочковидный»; все рабдовирусы вытянуты в длину и имеют форму или пули (закругленные на одном конце и плоские на другом), или бациллы (закругленные на обоих концах). Классификация, основанная исключительно на морфологии, привела к весьма странному на первый взгляд объединению вирусов, инфекционных для столь несхожих хозяев, как растения, млекопитающие, рыбы и насекомые (табл. 23.1). При более полном сопоставлении довольно неожиданно выяснилось, что некоторые из этих вирусов помимо характерной морфологии имеют много других общих свойств и, несмотря на весьма различный спектр хозяев, оказываются родственными.

К рабдовирусам относится ряд важных в экономическом отношении (патогенных для животных и растений) вирусов, а также летальный вирус бешенства [44]. Их геном представлен одноцепочечной РНК с мол. массой $(4-5) \cdot 10^6$, которая кодирует небольшое число белков, обычно пять. В ранних работах показано, что депротеинизированная геномная РНК не инфекционна. Как мы теперь знаем, это наблюдение отражает тот факт, что вирусная РНК имеет негативную полярность (т. е. комплементарна мРНК), и, следовательно, для синтеза мРНК вирус, заражающий клетку, должен содержать вирус-специфическую РНК-зависимую РНК-полимеразу.

Рабдовирусы удобно рассматривать как частицы, состоящие из двух структурных единиц с различными функциями: рибонуклеокапсида и оболочки (рис. 23.1). Геномная РНК инкапсулируется по всей своей длине единственным главным струк-

¹ *Suzanne Urjil Emerson, Microbiology Department, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia 22908.*

Таблица 23.1. Рабдовирусы¹⁾

<i>Рабдовирусы позвоночных и беспозвоночных:</i>	<i>Рабдовирусы растений и беспозвоночных:</i>
везикулярного стоматита	желтого некроза спаржи
Чандипура	желтого некроза латука
Пирн	желтых прожилок осота
бешенства	морщинистости клубники
летучих мышей Лагос	желтой бороздчатой мозаики ячменя
Мокола	мозаики кукурузы
Клатат	мозаики северных злаков
каньона Керн	желтой карликовости картофеля
Фландерс-Харт Парк	кратковременной желтизны риса
	русской зимней мозаики пшеницы
	бороздчатой мозаики пшеницы
летучих мышей горы Элгон	скручивания листьев сахарной свеклы
Эгтвед (геморрагической септицемии)	беладонны
инфекционного гемопозитического некроза	выростов клевера
болезни оregonских нерок	крапчатой карликовости баклажанов
болезни чавычи реки Сакраменто	выростов люцерны
карпа	подорожника
Сигма	хлоротических прожилок пшеницы

¹⁾ По Кнудсону [19], с сокращениями.

турным белком. Процесс инкапсидирования завершается формированием спирального нуклеокапсида, который в свернутом состоянии обуславливает форму зрелого вириона. Белки с активностью вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) присоединяются к нуклеокапсиду и образуют внутреннюю структурную единицу — рибонуклеопротеин, или РНП. РНП можно выделить из вирионов или из цитоплазмы зараженных клеток; при последующем введении в клетку он проявляет инфекционность. Вторая структурная единица — вирусная оболочка — окружает РНП и, с одной стороны, защищает геном от разрушения, а с другой — помогает проникнуть внутрь клетки. Хотя оболочка не является необходимой для заражения, она повышает инфекционность на 3—5 порядков. Оболочка состоит из липидного бислоя, усеянного снаружи гликопротеиновыми выступами и выстланного изнутри мембранным белком. Хотя этот белок обычно называют компонентом оболочки, такое определение может ввести в заблуждение, поскольку он взаимодействует также с РНП и на самом деле служит своего рода клеем, скрепляющим две структурные единицы.

Все рабдовирусы имеют сходные размеры; диаметр зрелых вирусных частиц колеблется от 60 до 85 нм, а длина пропорциональна длине РНК и составляет для рабдовирусов живот-

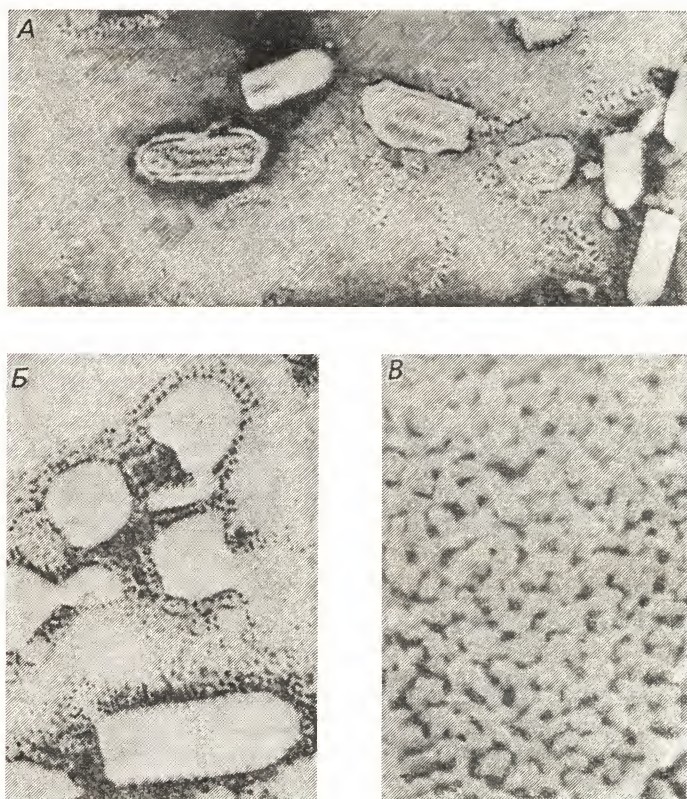


Рис. 23.1. А. Вирионы и нуклеокапсиды VSV (негативное контрастирование). Б. Смесь стандартных и дефектных интерферирующих частиц (негативное контрастирование); $\times 230\,000$. В. Скопление почкующихся вирионов VSV на поверхности сенсорного нейрона мыши (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа); $\times 30\,000$. Фотографии предоставлены Моникой Дюбуа-Дальк.

ных 180 нм, а для рабдовирусов растений — величину несколько большую. Кроме того, многие рабдовирусы образуют делеционные мутанты. Поскольку эти мутанты содержат РНК меньше, чем стандартный вирус, длина их нуклеокапсидов, а следовательно, и зрелых частиц меньше. Раньше делеционные мутанты называли укороченными (truncated), или Т-частицами [34]. Теперь же их называют дефектными интерферирующими частицами (или ДИ-частицами), что отражает их биологические свойства. Дело в том, что ДИ-частицы не способны автономно реплицироваться и нуждаются в присутствии стандартного ви-

руса; в то же время они интерферируют с репликацией стандартного вируса.

Рабдовирусы, как правило, переносятся членистоногими. Следовательно, рабдовирусы животных могут размножаться в клетках как позвоночных, так и членистоногих, а рабдовирусы растений — в клетках членистоногих и растительных клетках [19]. Выяснилось, что вирусы животных не способны размножаться в растительных клетках, а вирусы растений — в клетках позвоночных. Поскольку к рабдовирусам относят огромное количество вирусов, большая часть которых изучена плохо, исчерпывающий сравнительный анализ провести невозможно. Поэтому информация, представленная в следующих разделах, основывается главным образом на изучении вируса-прототипа — вируса везикулярного стоматита.

Вirus везикулярного стоматита (VSV) патогенен для крупного рогатого скота, у которого он вызывает поражения полости рта; кроме того, он является источником заболеваний у свиней и лошадей. Он эффективно размножается в культуре ткани и может быть легко очищен. VSV обладает широким спектром хозяев и может размножаться в клетках самых различных животных: рыб, насекомых и многих других. В тестах на нейтрализацию выявлены два серотипа VSV, названные Индиана и Нью-Джерси. Несмотря на явное родство двух серотипов, в опытах по отжигу РНК для их генов обнаружено не более 10% гомологии. Геном VSV-Индиана полностью секвенирован, он содержит 11 162 нуклеотида. Свой генетический потенциал вирус использует весьма эффективно: более 98% генома транскрибируется с образованием пяти вирусных мРНК, а 95% последовательностей мРНК подвергаются трансляции; каждая мРНК кодирует один белок. Если учесть ограниченность вирусного генетического материала и необходимость синтеза собственной полимеразы, кажется удивительной способность VSV заражать эукариотические клетки столь широкого спектра. Естественнее было бы предположить, что такой вирус во многих своих функциях будет зависеть от хозяина. Наиболее вероятное объяснение этому парадоксу состоит в том, что большинство вирусных белков, если не все, являются мультифункциональными.

Химические исследования указывают на то, что в состав вириона VSV-Индиана входит 64% белков, 20% липидов, 13% углеводов и 3% РНК. Липидный и углеводный компоненты синтезируются клеточными ферментами и поэтому в разных клетках-хозяевах до некоторой степени варьируют. Гены VSV расположены в геноме следующим образом: 3'-лидер-N-NS-M-G-L-5'. В процессе транскрипции формируется градиент концентрации мРНК таким образом, что N-мРНК присутствует в

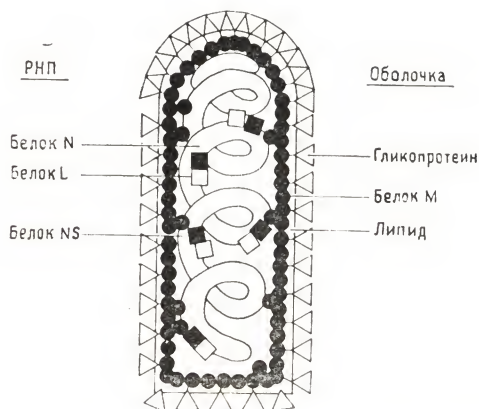


Рис. 23.2. Схематическое изображение вириона вируса везикулярного стоматита (VSV).

наибольших количествах, а L-мРНК в наименьших. N-Белок (от англ. nucleocapsid) — это главный структурный белок вириона, образующий чехол, в котором упакована геномная РНК (рис. 23.2). L-Белок (от англ. large) и NS-белок также являются компонентами РНК и в совокупности функционируют как полимеразы. Гликопротеин G формирует выступы оболочки вириона, в то время как M-белок (от англ. matrix) размещен между липидом и РНК.

Поскольку рабдовирусы не способны к генетической рекомбинации, для их изучения нельзя применить многие продуктивные подходы классической генетики. Вместе с тем для VSV характерен очень высокий, достигающий 2% уровень спонтанных мутаций, что дает возможность выделять условно-летальные мутанты [33]. Большинство выделенных мутантов являются температурочувствительными (*ts*); удалось также получить мутанты по спектру хозяев. Тесты на комплементацию выявили у *ts*-мутантов пять, а возможно, и шесть групп комплементации. Шестая группа, очевидно, отражает внутригенную комплементацию L-белка.

Прикрепление, проникновение и раздевание вируса

Рабдовирусы животных сходны с другими имеющими оболочку вирусами в том, что вирусным компонентом, ответственным за связывание с рецептором клетки-хозяина, является гликопротеин. Поэтому избирательное устранение гликопротеина

VSV посредством протеолитического расщепления снижает инфекционность вируса примерно на пять порядков, а антитела против гликопротеина эффективно нейтрализуют вирус. Кроме того, прогретые вирионы *ts*-мутантов с термолабильным G-белком не способны заражать клетку. Область в молекуле гликопротеина, ответственная за прикрепление к клетке, до сих пор не идентифицирована, однако уже получены моноклональные антитела к отдельным детерминантам G-белка, причем некоторые из них блокируют инфекционность VSV, а другие — нет. Поэтому скоро станет возможным идентифицировать области белковой молекулы, вовлеченные в процесс прикрепления. Олигосахаридные цепи в G-белке, по-видимому, несущественны для прикрепления к клетке, поскольку культивируемый в присутствии туникамина VSV, содержащий негликозилированный G-белок, обладает инфекционностью, сравнимой с инфекционностью VSV, содержащего гликозилированный G-белок [8].

Отдельные стадии инфекционного процесса, включающие взаимодействие вирус—клетка, дифференцировать довольно трудно. Основные проблемы связаны с тем, что в инфекционном процессе участвует только небольшая доля вирусных частиц; поэтому необходимо различать вирусные частицы, продуктивно заражающие клетку и взаимодействующие с ней без продукции вируса. Для того чтобы различить вирусы, проникающие внутрь клетки и просто прикрепляющиеся к ее поверхности, часто используют обработку зараженных клеток протеазой. Поскольку транскрипция — первая стадия синтеза, осуществляемая проникшим вирусом, в качестве показателя продуктивной инфекции часто используют уровень синтеза вирусных мРНК. Учитывая эти обстоятельства, можно сформулировать общие принципы проникновения рабдовирусов в клетку. Необычайно широкий спектр хозяев VSV свидетельствует о том, что его рецептор является компонентом практически любых клеток. Эксперименты по связыванию вируса с клеткой показывают, что внутрь проникает лишь небольшая часть вирионов, прикрепившихся к клеточной поверхности; поэтому поиск рецептора оказался задачей не из легких. Эксперименты по конкурентному связыванию указывают на возможность насыщения рецептора клеток Vero VSV [39]. Обработка клеток протеазой не препятствует связыванию, но его можно полностью ингибировать фосфатидилсерином — компонентом, общим для всех клеточных мембран [38]. Поскольку фосфатидилсерин ингибирует также процесс бляшкообразования у VSV, а липосомы, содержащие фосфатидилсерин, способны связывать его вирионы, предполагают, что это вещество играет роль клеточного рецептора или его фрагмента.

Эксперименты по связыванию вируса бешенства дали дру-

гие результаты. При связывании с тканью вирус бешенства концентрируется в нервно-мышечных контактах. Этот процесс ингибируется α -бунгаротоксином и *d*-тубокурарином, каждый из которых способен связываться с ацетилхолиновыми рецепторами. Следовательно, последние могут служить высокоэффективными рецепторами для вируса бешенства [22]. Этот вывод помогает понять природу нейротропности вируса, но, поскольку *in vitro* он заражает не только нервные клетки, должны существовать также и другие рецепторы.

Хотя рабдовирусы имеют липидную оболочку, в клетку они проникают в основном с помощью эндоцитоза, а не путем прямого слияния с мембраной. В отличие от парамиксовирусов у рабдовирусов нет специального белка, ответственного за слияние с клеточной мембраной, и этот процесс удается наблюдать только при кислых значениях рН или после осаждения вирионов на клетки с помощью центрифугирования. Электронно-микроскопический анализ показал, что связанный с клеткой VSV концентрируется в участках плазматической мембраны, выстланных клатрином, и обнаруживается в цитоплазматических везикулах, которые образовались в результате эндоцитоза выстланных клатрином ямок. Роль эндоцитоза в инфекционном процессе подтверждается также в опытах с использованием ингибиторов. Дансилкадаверин и амантадин, не влияющие на связывание с клеточной мембраной, но ингибирующие опосредованный рецептором эндоцитоз, крайне затрудняют проникновение вируса и последующий синтез вирусных РНК [37]. Проникшие внутрь клетки вирионы затем обнаруживаются во вторичных эндосомах, где поддерживаются кислые значения рН, при которых и VSV, и вирус бешенства могут сливаться с мембранами. Предполагают, что слияние вируса с мембраной лизосомы, вызываемое кислой средой, приводит к раздеванию вируса и выбросу рибонуклеопротеина в цитоплазму [30]. Такой путь инфекции и на сей раз подтверждается опытами с применением ингибиторов. Лизосомотропные агенты — хлорид аммония и хлорохин — накапливаются в лизосомах и поднимают рН выше того уровня, при котором возможно слияние VSV с мембраной. При добавлении этих веществ на ранних стадиях инфекции не ингибируется ни связывание VSV, ни его проникновение внутрь клетки, но урожай вируса существенно уменьшается [27]. Изучая влияние других лизосомотропных аминов на синтез вирусных РНК, установили, что максимальное подавление синтеза достигается в том случае, когда ингибитор добавляют непосредственно в процессе заражения. Чем позже добавляют ингибитор, тем менее выражен эффект. Процесс ингибирования обратим и может быть приостановлен отмывкой клеток от ингибитора. Полученные данные говорят о том, что

перед инициацией синтеза РНК инфекционные вирионы VSV должны попасть в эндосомы. Хотя это заключение не бесспорно, обычно полагают, что раздевание рабдовирусов, как и многих других вирусов с оболочкой, происходит согласно описанному выше механизму.

Синтез РНК

Первой стадией в инфекционном цикле любых РНК-вирусов с негативным геномом является синтез мРНК. В эукариотических клетках нет РНК-зависимой РНК-полимеразы; поэтому для экспрессии своего генома рабдовирусы должны иметь собственную полимеразу и упаковывать этот фермент в зрелые вирусные частицы. Сразу же после удаления оболочки инфекционный вирус с помощью фермента, привнесенного им в клетку, начинает транскрипцию.

В основном сведения о транскрипции рабдовирусов базируются на опытах *in vitro* с использованием очищенных вирионов. В соответствующих условиях высокоочищенный VSV способен воспроизвести в пробирке все стадии синтеза и модификации мРНК. Продукты транскрипции стандартного вируса как *in vivo*, так и *in vitro* представляют собой пять моностронных матриц и лидерную РНК (рис. 23.3). Все мРНК напоминают эукариотические мРНК наличием кэпа (7-mG) на 5'-конце и длинной полиадениловой последовательности на 3'-конце. Полиаденилирование происходит по механизму «пробуксовывания», а сигналом для него служит последовательность длиной 11 нуклеотидов, расположенная на 3'-конце каждого гена. Пять мРНК транслируются с образованием пяти белков. Лидерная РНК имеет длину всего

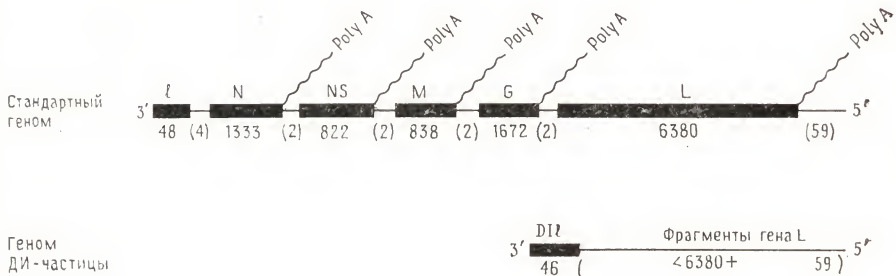


Рис. 23.3. Структура генома стандартного VSV и одного из классов ДИ-частиц этого вируса. Сверху указан порядок генов. Цифры в скобках обозначают число нуклеотидов, не входящих в состав продуктов транскрипции. Транскрибируемые области изображены темными прямоугольниками, а снизу указан размер соответствующих транскриптов в нуклеотидах.

48 нуклеотидов и не подвергается ни кэпированию, ни полиаденилированию. Она считывается непосредственно с 3'-конца генома и не транслируется. Дефектные частицы также содержат вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу, но, за редкими исключениями, не способны синтезировать мРНК: единственным продуктом их транскрипции является ДИ-лидерная РНК. Эта РНК, как и лидерная РНК стандартного вируса, имеет небольшой размер (46 нуклеотидов), не кэпируется, не аденилируется и считывается с 3'-конца генома. Из 17 первых нуклеотидов в ДИ-лидерной РНК 14 идентичны таковым стандартной лидерной РНК, а далее последовательности не совпадают.

Опыты *in vitro* с вирусными субчастицами, полученными с помощью избирательной диссоциации вирионов или реконструирования из очищенных белков, показали, что из пяти вирусных полипептидов три необходимы для транскрипции.

Депротеинизированная геномная РНК не может служить матрицей для вирусной полимеразы; матрицей является спиральный рибонуклеокапсид, состоящий из РНК, прочно связанной с N-белком. L- и NS-белки скорее всего представляют собой субъединицы полимеразы, поскольку оба они необходимы для транскрипции *in vitro*, а некоторые *ts*-мутации по этим белкам делают невозможной транскрипцию при непермиссивной температуре *in vivo*. Два белка оболочки M и G не существенны для транскрипции *in vitro*: рибонуклеокапсиды без G- и M-белков, но содержащие белки L и NS, вызывают продуктивную инфекцию, если их вводят в клетку с помощью диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-декстрана. До сих пор не удалось получить заметных количеств некэпированных или же неаденилированных мРНК ни с помощью генетических, ни с помощью биохимических подходов. Поэтому неизвестно, какие именно белки отвечают за эти модификации. Поскольку они могут осуществляться очищенными вирионами и поскольку транскрипция и модификация РНК тесно сопряжены, есть основания считать, что этот процесс осуществляют вирусные, а не клеточные белки. Во всяком случае метилирование кэпа и ближайшего аденилового остатка является несомненно вирусной функцией, так как некоторые мутанты VSV по спектру хозяев дефектны по метилированию *in vitro* [11].

NS-Белок представляет собой фосфопротеин; при двумерном электрофорезе в полиакриламидном геле разрешается до 13 полос фосфорилированных молекул [12]. Возможно, уровень фосфорилирования влияет на функцию NS-белка [14]. Молекулы этого белка можно разделить на две фракции: с высоким и низким уровнем фосфорилирования. Высокофосфорилированная фракция стимулирует транскрипцию *in vitro*, в то время как фракция с низким уровнем фосфорилирования неактивна в

реконструированной системе [17]. В вирионы упаковываются также протеинкиназы клеточного происхождения, способные фосфорилировать белок NS *in vitro*, но неизвестно, имеет ли это фосфорилирование какое-либо отношение к транскрипции.

Геном РНК-содержащих вирусов, в том числе рабдовирусов, содержит несколько генов и для осуществления своего репликативного цикла нуждается более чем в одном белковом продукте. Поскольку вирусные мРНК транслируются эукариотическими рибосомами, которые не способны распознавать при трансляции несколько генов в составе одной молекулы мРНК, РНК-содержащие вирусы разработали несколько вариантов стратегии, позволяющей экспрессировать все свои гены. Например, полноразмерная мРНК вируса полиомиелита транслируется с образованием одного гигантского полипротеина, который в дальнейшем нарезается на индивидуальные белковые продукты, а каждый ген вируса гриппа локализован в отдельном сегменте РНК, так что в результате транскрипции автоматически образуются моноцистронные мРНК. У рабдовирусов геном транскрибируется не целиком с образованием единой мРНК, а по отдельности—с образованием индивидуальных моноцистронных мРНК. Этот способ транскрипции приводит к появлению мРНК, непосредственно доступных для нормального эукариотического аппарата трансляции, и в то же время позволяет регулировать количество отдельных мРНК. Опыты по инаktivации УФ-светом показали, что транскрипция VSV осуществляется последовательно и полярно: транскрипция каждого гена происходит только после того, как транскрибировались все гены, расположенные между ним и 3'-концом генома, причем количество каждой мРНК уменьшается по мере удаления соответствующего гена от 3'-конца генома.

Для транскрипции VSV предложены две основные модели, принимающие во внимание последовательный синтез мРНК и их моноцистронную природу. Согласно первой из них, для каждого гена постулируется наличие своего промотора и сайта присоединения полимеразы [5]. Эта модель учитывает то обстоятельство, что *in vitro* частичное ингибирование транскрипции, вызванное УФ-инаktivацией или отсутствием в реакционной смеси GTP или UTP, приводит к синтезу коротких олигонуклеотидов, соответствующих 5'-концу различных мРНК. Это означает, что полимеразы VSV действительно способны инициировать синтез РНК в нужных сайтах внутренних генов. Хотя эта «многопромоторная» модель легко объясняет образование моноцистронных мРНК, она плохо согласуется с данными, указывающими на последовательную транскрипцию генов.

Вторая модель предполагает наличие единственного сайта присоединения полимеразы на 3'-конце генома [7, 15]. Она хо-

рошо объясняет последовательное появление различных мРНК, но не объясняет, почему *in vitro* в abortивных реакциях синтезируются концевые участки разных мРНК. Следовательно, она нуждается в некоторых модификациях. На основании данных, полученных с использованием реконструированных систем, предположили, что полимеразы узнают геном исключительно в 3'-концевой промоторной области, а затем продвигаются по геному. Этот процесс происходит непрерывно, пока практически весь геном не окажется насыщенным ферментом, а сами «насыщенные» матрицы не упакуются в почкующиеся вирионы. В составе таких «насыщенных» матриц некоторые молекулы фермента располагаются вблизи начала внутренних генов; когда блок транскрипции снимается, полимеразы могут возобновить ее с внутренних сайтов. Смысл подобного механизма состоит в том, что полимеразы, достигая внутреннего гена, могут инициировать там транскрипцию. Однако, поскольку узнавание матрицы происходит исключительно на 3'-концевом промоторе, транскрипция неизбежно оказывается последовательной. В таком случае снижение уровня транскрипции генов по мере их удаления от 3'-конца отражает вероятность досрочного отсоединения полимеразы от матрицы.

Модель единственного промотора предполагает образование моноцистронных мРНК или в результате нуклеазного гидролиза полноразмерного РНК-предшественника, или по механизму «стоп—старт», когда полимеразы последовательно перемещаются по геному и на границе генов иницируют и терминируют транскрипцию. Существующая информация не позволяет выбрать одну из двух описанных моделей. Обнаружение олигорибонуклеотидов, начинающихся с нуклеозидтрифосфатов, свидетельствует в пользу механизма «стоп—старт», тогда как обнаружение ковалентно связанных мРНК, считанных с соседних генов, подтверждает наличие процессинга. Оказалось, что и ковалентно сшитые транскрипты, и олигонуклеотиды, начинающиеся с нуклеозидтрифосфатов, появляются с низкой частотой. Однако ни те ни другие не превращаются в зрелые мРНК. Поэтому невозможно оценить, являются ли они нормальными интермедиатами или же артефактами aberrантной транскрипции. В то же время вопрос, какой из двух предложенных механизмов является основным, очень важен, так как он имеет прямое отношение к механизму репликации РНК.

Репликация рабдовирусов осуществляется в две стадии (рис. 23.4). Минус-цепь в составе рибонуклеокапсида служит матрицей для синтеза комплементарной РНК, совпадающей по размеру с геномной. N-Белок связывается с новосинтезированной РНК, образуя рибонуклеокапсид, содержащий плюс-геномную РНК, после чего процесс повторяется и на плюс-РНК этого

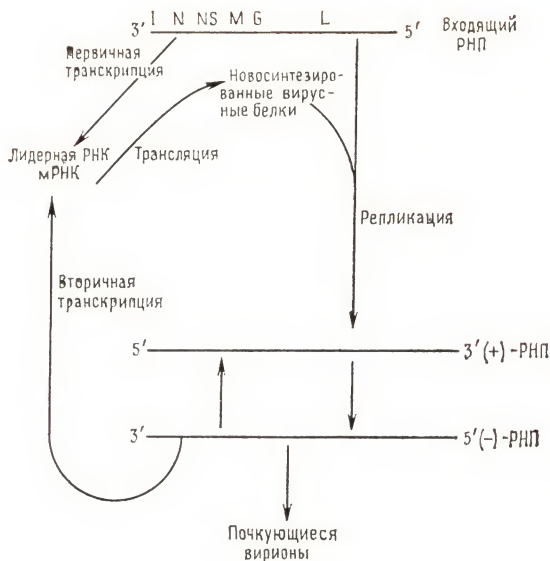


Рис. 23.4. Схема репликативного цикла VSV.

рибонуклеокапсида как на матрице образуются новые минус-цепи. Идентичные ли ферменты синтезируют плюс- и минус-цепи, пока неизвестно.

Изучение *ts*-мутантов показало, что в процесс репликации вовлечены N-, NS- и L-белки. Поскольку матрицы для транскрипции и для синтеза плюс-цепей в ходе репликации одинаковы, неудивительно, что эти процессы контролируются одними и теми же белками. Принципиальным является вопрос о регуляции синтеза РНК: почему в первом случае продуцируются моноцистронные мРНК, а во втором — полноразмерные репликативные РНК? Репликация отличается от транскрипции тем, что зависит от синтеза вирусных белков. Если клетки, зараженные VSV, обработать циклогексимидом — ингибитором трансляции, — репликативный синтез РНК прекращается, а транскрипция нет. Этот результат показывает, что для репликации необходим постоянный синтез одного или нескольких белков. Какие это белки — неизвестно, но есть основания считать, что они имеют вирусную природу. Как следует из опытов с делеционным мутантом VSV (HRLT1), репликация может поддерживаться на низком уровне даже в отсутствие вируса-помощника. У этого мутанта нет гена L, следовательно, новосинтезированный L-белок для репликации необязателен. Отсюда с очевидностью вытекает, что требуется синтез белка N, или белка

NS, или обоих. N-Белок мог бы быть необходимым для чисто структурной функции. Связываясь с вирусной РНК, он, во-первых, защищал бы ее от гидролиза нуклеазами и, во-вторых, делал бы ее способной служить матрицей для вирусных полимераз. Однако в зависимости от того, каков механизм транскрипции, N-белок мог бы также по-разному регулировать синтез РНК. Если для транскрипции справедлив механизм процессинга, то в ходе репликации необходимо блокировать нарезание предшественника и распознавание сигналов полиаденилирования. N-Белок, связанный с РНК, мог бы предотвращать процессинг. Высказано предположение, что выбор между репликацией и транскрипцией определяется размером пула свободного N-белка. Легко представить себе, как N-белок в ходе репликативного синтеза плюс-цепи предотвращает процессинг. Труднее понять, каким образом он блокирует сигналы полиаденилирования. Изучение ДИ-частиц еще более усложнило понимание процесса репликации. Транскриптаза VSV синтезирует только лидерную ДИ-РНК, после чего синтез прекращается. В системе трансляции *in vitro* мРНК N-белка стимулирует репликацию ДИ-рибонуклеокапсидов; отсюда следует, что новосинтезированный N-белок необходим для репликации ДИ-частиц и достаточен для преодоления терминирующих сигналов, хотя механизм его действия неизвестен. Вместе с тем, как выяснилось при изучении *ts*-мутантов, NS-белок также необходим для репликации и является субъединицей транскриптазы. Если транскрипция инициируется с единственного промотора, то этот промотор скорее всего узнается ферментами и транскрипции, и репликации. Можно допустить, что транскриптаза модифицируется таким образом, что по-прежнему узнает промотор и инициирует синтез РНК, но в процессе элонгации не реагирует ни на какие сигнальные последовательности. В таком случае, невзирая на терминирующие сигналы, осуществляется сквозное считывание, полиаденилирования не происходит, а репликация плюс- и минус-цепей как ДИ-, так и стандартного вируса протекает идентичным образом.

Весьма привлекательной представляется гипотеза, согласно которой выбор между репликацией и транскрипцией зависит от фосфорилирования белка NS. Имеется в виду, что в репликации участвует метаболически нестабильная форма NS и что для появления этой формы необходим продолжающийся синтез белка. Впрочем, нельзя исключить и возможность того, что регуляторным фактором репликации как минус-, так и плюс-цепей служат оба белка (N и NS) и что репликация ДИ-частиц происходит принципиально иначе, нежели репликация стандартного вируса.

В репликации VSV могут участвовать также клеточные

факторы. Это допущение основано на получении мутантов по спектру хозяев и на том, что VSV, несмотря на очень широкий спектр хозяев, все же не размножается в лимфобластоидных клетках, клетках почки и роговицы кролика. В последнем случае ограничения накладываются именно на стадию репликации РНК [9]. В чем именно заключается роль клеточных факторов, покажут дальнейшие эксперименты, хотя уже сейчас ясно, что в первую очередь должны быть исследованы клеточные киназы, которые, возможно, фосфорилируют белок NS.

Скорость репликации плюс- и минус-цепей стандартного VSV неодинакова: в норме минус-цепи синтезируются в четыре раза быстрее, чем плюс-цепи. При изучении кинетики этого процесса выявили две стадии репликативного цикла. На ранних этапах инфекции плюс- и минус-цепи синтезируются в отношении $\sim 1:1$, а на более поздних синтезируются преимущественно минус-цепи. Вместе с тем ДИ-частицы на протяжении всего инфекционного цикла синтезируют равные количества плюс- и минус-цепей. Ключ к пониманию механизма асимметричной репликации дает анализ концевых последовательностей обеих матриц. Первые 46—48 нуклеотидов на 3'- и 5'-концах РНК являются высококонсервативными, но они не идентичны у плюс- и минус-цепей стандартного вируса, что согласуется с различиями в скорости репликации цепей. Вместе с тем концевые последовательности у плюс- и минус-РНК ДИ-частиц идентичны на протяжении по крайней мере 46 нуклеотидов и соответствуют 3'-концевым последовательностям плюс-цепи стандартного вируса. Поскольку ДИ-частицы интерферируют со стандартным вирусом благодаря более эффективной конкуренции за лимитирующие факторы репликации и поскольку плюс-цепи стандартного вируса реплицируются более эффективно, чем минус-цепи, можно заключить, что преимущества в репликации обусловлены 3'-концевыми последовательностями плюс-цепей. Будучи локализованы на 3'-конце матрицы, они должны содержать промоторную последовательность для репликазы. Эксперименты по расщеплению РНК в присутствии белков с последующим олигонуклеотидным анализом указывают на то, что NS-белок связывается с теми последовательностями на 3'-конце стандартной минус-цепи, которые отличаются от таковых ДИ-матриц и стандартных плюс-цепей. Таким образом, если различия в первичной структуре обуславливают различия в прочности связывания репликазы, стандартная минус-цепь по сравнению с плюс-цепью и ДИ-матрицей содержит менее эффективный промотор. Это одно из объяснений различия в уровне репликации плюс- и минус-цепей.

Согласно другой точке зрения, если 3'-концевая последовательность матрицы в зеркальном отображении присутствует на

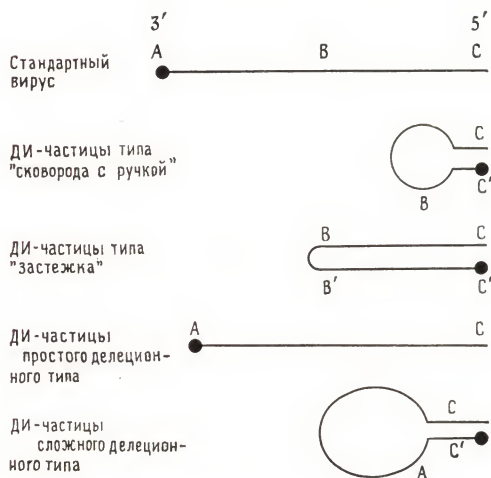


Рис. 23.5. Структура генома четырех классов ДИ-частиц VSV. Параллельные линии обозначают комплементарные последовательности, темный кружок — сайт присоединения вирусной транскриптазы. После инкапсидации белком N все геномы становятся линейными.

5'-конце синтезируемой РНК и если N-белок действительно регулирует репликацию, ее асимметричный характер можно объяснить различным родством N-белка к 5'-концам плюс- и минус-цепей. Независимо от того, какая возможность верна, ясно, что асимметричную репликацию плюс- и минус-цепей РНК могут вызывать даже небольшие различия в концевых последовательностях РНК VSV.

Иногда в репликации происходят ошибки, что приводит к появлению дефектных частиц [21]. Впрочем, реальную частоту ошибок репликации определить невозможно, поскольку отбором закрепляются только те дефектные частицы, которые имеют преимущества в репликации по сравнению со стандартным вирусом. При образовании дефектных частиц концы генома в общем сохраняются, поскольку как плюс-, так и минус-цепи этих частиц должны сохранить способность инкапсидироваться N-белком и узнаваться вирусной полимеразой.

Подавляющее большинство дефектных частиц относится к типам «сковорода с ручкой» и «застежка», а всего описано 4 типа ДИ-частиц (рис. 23.5). ДИ-частицы типа «сковорода с ручкой» и «застежка» сходны тем, что утратили 3'-конец стандартного генома, но сохранили 5'-концевой фрагмент гена L, а их 3'- и 5'-концы комплементарны на протяжении по крайней

мере 45 нуклеотидов. Поэтому 3'-концы как плюс-, так и минус-цепей ДИ-РНК идентичны и неотличимы от 3'-концов плюс-РНК стандартного вируса. Два других типа дефектных частиц представляют собой штаммы, полученные из одного стока. Оба они сохранили 3' и 5'-концы стандартного генома, но содержат внутреннюю делецию, затрагивающую большую часть гена L. Различаются они только тем, что один из них (HRLT2) содержит на 3'-конце дополнительные 70 нуклеотидов, которые комплементарны 5'-концу стандартного вируса, и поэтому концевые последовательности данного штамма сходны с таковыми большинства ДИ-частиц.

Как предполагают, ДИ-частицы образуются при отсоединении комплекса полимеразы — строящаяся цепь от матрицы и завершении репликации на другой матрице или в другом месте той же матрицы. В случае дефектных частиц типа «сковорода с ручкой» РНК-полимераза с присоединенной дочерней цепью, используя строящуюся цепь как матрицу, возобновляет репликацию в определенном сайте новообразованной цепи, отстоящем от 5'-конца на 43—48 оснований. Этот процесс приводит к появлению комплементарных концов длиной около 50 нуклеотидов (ручка «сковороды»). Образование ДИ-частиц типа «застежка» или «шпилька» объясняется другой моделью. Согласно этой модели, матрицу реплицируют одновременно две молекулы полимеразы. Вторая молекула, догнав первую, проходит через репликативную вилку и в результате синтезирует РНК, состоящую из двух комплементарных половинок. Поскольку ДИ-частицы описанных двух типов содержат 5'-конец стандартного вируса, они должны были образоваться в ходе синтеза минус-цепи (при использовании плюс-цепи в качестве матрицы). Внутренние делеции, характерные для ДИ-частиц двух других типов, могли образоваться в результате возобновления репликации на той же матрице или матрице такой же полярности, но какой именно, плюс или минус, мы не знаем. Неизвестно также, почему большинство ДИ-частиц относится к классу «сковорода с ручкой» или «шпилька». Возможно, они лучше отбираются по той причине, что содержат предполагаемые высокоэффективные сайты связывания полимеразы как на плюс-, так и на минус-цепях в отличие от других ДИ-частиц, содержащих интактные 3'- и 5'-концы стандартного вируса. В пользу этого предположения говорит тот факт, что HRLT2, идентичный мутантам с внутренней делецией, но содержащий на 3'-конце 70 дополнительных нуклеотидов, избирательно накапливается при повторных пассажах.

Синтез и созревание вирусных белков

мРНК рабдовирусов эффективно транслируются рибосомами клетки-хозяина. Для регуляции количества каждого белка используется скорее не трансляционный, а транскрипционный контроль. В случае VSV количество синтезируемых вирусных белков пропорционально количеству соответствующих мРНК. Поскольку транскрипция VSV последовательна и полярна, ее наиболее высокий уровень достигается для N-мРНК и, следовательно, для N-белка, а наименьший для L-мРНК и L-белка. Фракционирование клеточных экстрактов и опыты с импульсной меткой показали, что каждый вирусный белок проходит свой путь созревания, который завершается переносом на клеточную мембрану, где происходят сборка и почкование зрелых вирионов.

Рабдовирусы состоят из двух отдельных морфологических единиц — оболочки и рибонуклеопротеина (РНП). РНП, состоящий из РНК и белков N, NS и L, собирается как отдельная структура в цитоплазме координированно с репликацией вирусной РНК. Основным белком РНП является N-белок, который включается в РНП, не подвергаясь пост-трансляционным модификациям. Новосинтезированный N-белок перед сборкой в РНП входит в пул растворимых цитоплазматических белков. При этом он избирательно инкапсидирует только репликативные РНК, хотя более 90% последовательностей, входящих в состав репликативной плюс-геномной РНК, представлено и в мРНК. Предполагают, что избирательность инкапсидирования обусловлена последовательностями лидерной РНК [2]. Опыты по конкуренции *in vitro* выявили предпочтительное связывание N-белка с лидерной РНК, которое происходит на ее 5'-конце. Согласно принятой в настоящее время модели, лидерная РНК содержит сигнал, необходимый для связывания первой молекулы N-белка. После связывания первой молекулы происходит последовательное быстрое присоединение новых молекул, что приводит к инкапсидированию всех последовательностей РНК в 3'-направлении от начальной точки связывания. У мРНК нет сигнала для начала связывания, поэтому они не инкапсидируются. Предполагают, что таким сигналом служит последовательность из 15 нуклеотидов, каждый третий остаток в которой — адениловый. Независимо от того, играет ли роль сигнала определенная первичная последовательность или определенная вторичная структура, сигнал инициации связывания должен быть локализован в пределах первых 18 нуклеотидов лидерной РНК, так как именно эта область в плюс- и минус-цепях стандартных вирусов и ДИ-частиц одинакова. При этом N-белок не полностью закрывает узнаваемые нуклеотиды, поскольку в составе

РНП они столь же доступны для таких модифицирующих агентов, как диметилсульфат, как и в составе депротеинизированной РНК.

Не исключено, что размер пула N-белка регулирует переключение с транскрипции на репликацию. Когда этот пул велик, N-белок способен связываться с лидерной РНК даже в составе вновь синтезируемой цепи и тем самым препятствовать процессингу РНК или преодолевать аттенуацию. Если же размер пула незначителен, лидерная РНК может избежать инкапсидирования до отсоединения от матрицы, и в этом случае осуществляется транскрипция.

Добавление N-белка приводит к накоплению в цитоплазме РНП, содержащих как плюс-, так и минус-геномные РНК. РНП, содержащие плюс-РНК, остаются в цитоплазме, и их единственная функция — служить матрицей для синтеза минус-цепей. Новосинтезированные минус-РНП могут использоваться или как матрицы для синтеза мРНК (вторичная транскрипция), или для репликативного синтеза плюс-цепей РНК, или для включения в почкующиеся вирионы.

С цитоплазматическими РНП ассоциированы также два белка с полимеразной активностью — NS и L, но пути их созревания различны, причем эти пути отличаются и от пути созревания N-белка. NS-Белок интенсивно фосфорилируется по сериновым и треониновым остаткам, что приводит к гетерогенности популяции его молекул. Пептидное картирование выявляет по меньшей мере 21 сайт фосфорилирования NS-белка в клетках ВНК, причем некоторые сайты фосфорилируются чаще других [14]. Однако в какой мере фосфорилирование определяет функцию NS-белка, все еще неясно.

Опыты на клетках яичника китайского хомячка (СНО) привели к предположению о компартментации двух популяций белка NS, различающихся на 10% по степени фосфорилирования, причем с РНП ассоциирована популяция с меньшим уровнем фосфорилирования [6]. Вместе с тем в клетках ВНК такой компартментации не наблюдали. Для разделения молекул NS использовали ионообменную хроматографию. Оказалось, что транскрипция *in vitro* идет только в присутствии более фосфорилированных молекул. Белок NS, выделенный из растворимой цитоплазматической фракции, по своей подвижности в геле отличается от вирионной формы малой степенью фосфорилирования и неспособностью поддерживать транскрипцию в реконструированных системах. Хотя высокий уровень фосфорилирования коррелирует со способностью поддерживать транскрипцию, неясно, существенны ли все или некоторые из фосфорилированных остатков для активности белка NS, или же эта корреляция случайна.

Несмотря на то что в вирионах и РНП белок NS является минорным компонентом, в зараженных клетках он представлен в очень большом количестве. Он необычен тем, что способен накапливаться в растворимой цитоплазматической фракции. Опыты с импульсной меткой показали, что в этой фракции появляется и остается $\sim 75\%$ новосинтезированных молекул NS [13]. Остальные 25% минуют растворимую фракцию и вместе с белком L включаются непосредственно в реплицирующиеся нуклеокапсиды. Существуют ли структурные различия между молекулами NS, включающимися в РНП и остающимися в растворимой фракции, пока не выяснено. Высокая концентрация белка NS в цитоплазме позволяет предположить наличие у него какой-то функции, правда, доказательств в пользу этой точки зрения нет.

Белок L не выявляется в цитоплазматической фракции, сразу же после синтеза он включается в РНП. В составе реплицирующихся РНП обнаружены новосинтезированные NS и L, из чего следует, что сборка РНП включает несколько сопряженных стадий. Опыты по насыщению позволяют установить, что в составе РНП присутствует около 140 молекул L-белка и 230 молекул белка NS. Поскольку связывание этих белков вплоть до насыщения происходит в отсутствие транскрипции, а число связывающихся молекул существенно больше того, которое может связаться с промотором, этот процесс является по существу процессом упаковки. В результате инфекционный вирион обеспечивается достаточным запасом полимераз. Незвестно, с чем взаимодействуют в процессе насыщающего связывания полимеры: с РНК или с N-белком. По крайней мере L-белок в отсутствие белка NS не способен связываться с РНК, а NS-белок в отсутствие L-белка способен.

Сборка оболочки вириона начинается с включения вирусного гликопротеина в плазматическую мембрану клетки. Гликопротеин VSV-Индиана претерпевает сложный путь созревания, включающий протеолитическое нарезание, присоединение и процессинг олигосахаридов, присоединение жирных кислот [51]. Эти модификации осуществляются одна за другой в ходе синтеза и последующего транспорта G-белка к поверхности клетки. Изучение кинетики этого процесса показало, что для достижения клеточной мембраны новосинтезированному G-белку требуется по меньшей мере 15 мин. В отличие от четырех других вирусных белков G-белок всегда связан с мембраной, а его мРНК обнаруживается в рибосомах, связанных с мембранами. N-конец G-белка содержит гидрофобную сигнальную последовательность, которая взаимодействует с мембраной эндоплазматического ретикула (ЭР). Очевидно, именно эта область новосинтезированного полипептида инициирует связывание рибо-

сом с мембраной. В ходе синтеза белковой молекулы N-концевая область G-белка проникает через мембрану и оказывается в просвете ЭР, где первые 16 аминокислотных остатков удаляются протеолитическим расщеплением. В процессе трансляции синтезируемый полипептид постоянно продвигается через мембрану в просвет ЭР. Гликозилирование происходит тогда, когда в просвет выходят соответствующие сайты — два аспаргиновых остатка в 178-м и 335-м положениях, на которые с липидного носителя переносятся уже готовые сложные олигосахаридные цепи. После завершения трансляции G-белок ориентирован несимметрично; его основная часть находится в просвете ЭР, следующие 20 аминокислотных остатков «заякорены» в мембране, а 29 C-концевых остатков находятся в цитоплазме. Далее гликопротеин переносится в аппарат Гольджи, где происходит его дальнейший процессинг, в частности созревание сложных олигосахаридов: одни концевые сахара удаляются, а другие — обычно нейраминовые кислоты — присоединяются. Поскольку отдельные стадии гликозилирования осуществляются клеточными трансферазами, состав концевых сахаров в разных клетках варьирует. Когда G-белок VSV-Индиана уже находится в аппарате Гольджи, к нему вблизи карбоксильного конца ковалентно присоединяются 1—2 молекулы жирных кислот [3, 40]. Роль этих кислот не ясна, т. к. у G-белка VSV-Нью-Джерси они отсутствуют. В конце концов G-белок переносится в клеточную мембрану, где и накапливается. При этом основная часть белковой молекулы располагается на внешней поверхности, а карбоксильный конец находится в цитоплазме. Точный механизм, направляющий перенос G-белка из одного компартмента в другой, неизвестен. Известно лишь, что его транспорт из ЭР в аппарат Гольджи и далее в плазматическую мембрану осуществляется в составе небольших окаймленных клатрином везикул [36]. В клетках MDCK специфичность транспорта еще более высокая. Здесь гликопротеин VSV транспортируется только на базолатеральную мембрану, а гликопротеин вируса гриппа — на апикальную поверхность.

M-Белок имеет относительно простой механизм созревания. Хотя он является белком наружной мембраны, его мРНК транслируется на свободных полисомах, а сам белок проходит через небольшой пул растворимых цитоплазматических белков. Поскольку M-белок выстилает внутреннюю поверхность липидной оболочки вириона, а также связывается с нуклеокапсидом, оказалось неожиданным, что он, не накапливаясь ни на клеточной мембране, ни в цитоплазматических РНП, непосредственно включается в состав вирионов из растворимой фракции. Опыты по кинетике позволяют предложить следующее объяснение: M-белок образует центр нуклеации при почковании и стоит ему

начать взаимодействие с мембраной или РНП, как дальнейшие стадии этого взаимодействия произойдут с такой быстротой, что их невозможно зарегистрировать.

Сборка вирионов

Почкование зрелых вирионов — сложный процесс, для которого необходимы ассоциированный с мембраной G-белок, растворимый M-белок и РНП-частицы. Все эти компоненты собираются на определенном участке мембраны [18]. Правда, ни сборка, ни собственно почкование в деталях не изучены, но есть основания считать, что ключевую роль играет M-белок: до сих пор не обнаружены вирионы без M-белка, хотя вирионы без G- или N-белка могут существовать. Отсюда следует, что M-белок совершенно необходим для созревания вирусных частиц. Предполагают, что он действует как мостик, связывающий РНП и оболочку. Он расположен очень близко как к G-, так и к N-белку, поскольку в вирионах, подвергшихся химической сшивке, обнаруживаются димеры типа G-M и N-M. Кроме того, M-белок способен вызывать сворачивание удлинённых РНП с образованием той уплотнённой конфигурации, которая присутствует в вирионах. Поскольку M-белок не обнаруживается *in vivo* ни на мембранах, ни в РНП, пока неясно, с чем он первоначально взаимодействует: с G-белком (возможно, через его направленный в цитоплазму карбоксильный конец) или с РНП. Результаты, полученные на мутантах, свидетельствуют в пользу первой возможности.

ts-Мутации в M-белке влияют на подвижность G-белка на поверхности клетки. Измерения флуоресценции показали, что при заражении нормальным вирусом дикого типа на протяжении всего репродуктивного цикла по меньшей мере 75% связанного с клеточной поверхностью G-белка высокоподвижны. Только небольшая фракция накапливается в месте сборки вириона, где происходит почкование [16]. При пермиссивной температуре некоторые *ts*-мутанты по M-белку характеризуются уменьшением мобильной фракции G-белка по сравнению с вирусом дикого типа. На основании этого можно заключить, что для вируса дикого типа фактором, лимитирующим скорость сборки, является образование комплекса M—G, а для мутантных вирусов образование комплекса M—РНП [35]. Поскольку у таких мутантов взаимодействие M-белка с РНП существенно ослаблено, это взаимодействие оказывается лимитирующим фактором и осуществляется уже после взаимодействия G—M [47]. Итак, согласно современным представлениям, M-белок обеспечивает почкование благодаря образованию локальных

кластеров с G-белком, после чего происходят быстрое присоединение РНП и почкование.

Хотя липидный состав оболочки вириона близок к аналогичному составу клеточной плазматической мембраны, часто он с ним не совпадает, т. е. включение липидов в мембрану вириона носит в какой-то степени избирательный характер. Довольно странно, что в ходе почкования из вирусной мембраны практически полностью исключаются вирусные белки. Механизмы, осуществляющие селекцию липидов и исключение белков, так же как и механизмы образования почки и высвобождения вириона, остаются неизученными.

Интересная проблема связана с отбором нуклеокапсидов для почкования. Известно, что в вирионы упаковывается только минус-цепь РНК, хотя N-белком инкапсидируются как минус-, так и плюс-геномные РНК. Следовательно, различия в первичной структуре между плюс- и минус-геномными РНК должны проявляться на стадии созревания вирионов. Вопрос в том, какой именно белок различает цепи. Наиболее вероятным кандидатом является М-белок. Когда *in vitro* он связывается с рибонуклеокапсидами, транскрипция ограничивается лидерной РНК и первыми 14 нуклеотидами гена N. Отсюда следует, что в связывании М-белка существует некоторая специфичность. Тем не менее остается невыясненным, взаимодействует ли М-белок с белками РНП или собственно с РНК и какова роль М-белка в селекции цепей.

Влияние на метаболизм клетки-хозяина

Рабдовирусы представляют собой цитолитические вирусы, быстро убивающие зараженные клетки. Гибели клетки предшествует эффективное выключение синтеза хозяйских белков, ДНК и РНК. До сих пор неизвестно, что является причиной гибели клетки: кумулятивное действие вируса на клеточный метаболизм или его действие на специфическую мишень. Почему клетка гибнет так быстро? Чтобы понять это, нужно иметь в виду, что при заражении затрагиваются три основных пути биосинтеза и различные клеточные линии обладают разной чувствительностью. Хотя общая картина того, как вирус убивает клетку, еще не сложилась, уже частично изучены факторы, выключающие отдельные биосинтетические пути. Для гибели зараженной клетки необходима не репликация вируса, а транскрипция вирусного генома, так же как для выключения всех трех биосинтетических путей [24, 25].

Поскольку репликация VSV происходит в цитоплазме зараженных клеток и может осуществляться даже в клетках, лишенных ядра, столь сильное влияние вируса на процессы, про-

текающие в ядре, вызывает удивление. VSV, например, существенно снижает уровень синтеза РНК всеми тремя клеточными РНК-полимеразами: Pol I, II и III. Опыты в реконструированных системах *in vitro* показали, что блокирование синтеза РНК обусловлено не необратимой инактивацией хозяйских транскриптаз, а скорее снижением частоты инициаций *in vivo* [46]. Эксперименты с *ts*-мутантами свидетельствуют о том, что для подавления синтеза клеточных РНК необходима транскрипция вирусного генома. Но по данным опытов с УФ-инактивацией транскрипции должна подвергнуться лишь малая часть генома, возможно только лидерная последовательность [45, 48]. Появление надежных систем для эукариотической транскрипции *in vitro* дало возможность изучать непосредственно влияние продуктов VSV на транскрипцию, обусловленную Pol II и III. Оказалось, что транскрипцию подавляют не сами вирусные белки, а очищенные вирусные транскрипты [28]. Ингибирующим действием обладали все изученные РНК, если их добавляли в высоких концентрациях, а небольшая лидерная последовательность плюс-цепи VSV ингибировала Pol II и III даже в низких концентрациях. Имеются и другие подтверждения роли лидерной РНК в подавлении синтеза хозяйской РНК. Установлено, что лидерная РНК, синтезированная ДИ-частицами, которые *in vivo* не ингибируют синтез РНК, в опытах по подавлению синтеза РНК *in vitro* по меньшей мере в 30 раз менее активна, чем стандартная лидерная РНК.

Пока нет ответа на вопрос, как именно лидерная РНК выключает синтез клеточных РНК. По-видимому, она может действовать непосредственно на аппарат транскрипции, так как на ранних стадиях заражения накапливается в ядре [20]. Правда, число молекул лидерной РНК на клетку оценивается в 300, а число клеточных РНК-полимераз — в тысячи. Интересен тот факт, что лидерная РНК обнаруживается в комплексе с белком La — клеточным антигеном, способным связываться с продуктами Pol III. Однако роль взаимодействия между лидерной РНК и белком La в выключении синтеза РНК вызывает сомнения, которые останутся до тех пор, пока не будет более подробно изучена транскрипция у эукариот.

Еще меньше мы знаем о том, как выключается синтез хозяйской ДНК. Впрочем, кажется вероятным, что за это отвечает та же функция VSV, которая выключает синтез РНК. Это предположение основывается на том, что кинетика обоих процессов одна и та же, что *ts*-мутанты способны осуществлять либо оба этих процесса, либо не осуществлять ни одного и, наконец, на том, что функциональный размер мишени для УФ-инактивации, блокирующей оба процесса, одинаков и весьма мал [29]. Однако не существует ни данных, прямо указывающих на

роль лидерной РНК в выключении синтеза ДНК, ни предполагаемых моделей ее действия.

В то время как выключение синтеза хозяйских РНК и ДНК осуществляется по сходному механизму, выключение синтеза хозяйских белков явно происходит совершенно иначе. Хотя для этого также необходима транскрипция вируса, функциональный размер мишени для УФ-инактивации белкового синтеза больше, чем для инактивации синтеза РНК или ДНК. Опыты по инактивации УФ показали, что для подавления белкового синтеза необходима транскрипция гена N, а возможно и NS. Не исключено, что требуется также трансляция этих генов [26]. Кроме того, даже когда в клетке полностью подавлен синтез ДНК и РНК, необходимым условием синтеза вирусных белков должна быть интактность трансляционного аппарата. Следовательно, подавление белкового синтеза избирательно по отношению к белкам клетки-хозяина и не затрагивает вирусных белков. Механизм избирательного выключения в настоящее время дискутируется. Простейшее объяснение, что трансляция подавляется в результате модификаций клеточных мРНК, пришлось исключить. Есть данные, как подтверждающие, так и опровергающие модель, согласно которой выключение синтеза белков происходит благодаря более эффективной конкуренции вирусных РНК за трансляционный аппарат [23, 41]. Уже изолированы нетемпературочувствительные мутанты с нарушенной способностью выключать белковый синтез, но эти мутации еще не картированы [42]. Опыты по трансляции *in vitro* с экстрактами зараженных и незараженных клеток выявили снижение трансляционной активности в лизатах зараженных клеток. По предварительным данным при этом затрагиваются факторы eIF2 [4] или eIF3/4B [43], но это не объясняет, почему все-таки преимущественно транслируются вирусные мРНК. Высказывалось предположение, что все дело в эффективности инициации трансляции различных мРНК и что мРНК VSV относятся к классу высокоэффективных матриц [32]. И на этот раз проблема состоит в том, чтобы выявить специфические стадии этого процесса, поскольку он происходит по-разному в зависимости от типа клеток и штамма вируса. Принимая во внимание противоречивые данные, можно полагать, что имеют значение все названные факторы, а масштабы их влияния зависят от конкретного типа клеток.

Вирусная персистенция

Несмотря на то что в целом рабдовирусы относятся к высоковирулентным цитопатическим вирусам, оказалось возможным получить несколько персистентно зараженных линий, или ли-

ний-носителей VSV и вируса бешенства. Для VSV персистентно зараженные линии получены из столь разных клеток, как клетки дрозиды, клетки ВНК и L-клетки. Для всех них характерен слабый цитопатический эффект и непрерывный, но низкий уровень продукции вируса. Некоторые зараженные культуры поддерживаются уже более 5 лет [10, 49].

Чтобы установить и поддерживать персистентную инфекцию, следует нейтрализовать нормальное цитопатическое действие вируса; при этом резко снижается его способность реплицироваться. Персистентная инфекция может запускаться стандартным вирулентным вирусом, если его репликацию подавить предварительной обработкой клеток интерфероном или заражать им совместно с большим количеством ДИ-частиц. Поддержание персистентной инфекции коррелировало со многими факторами, которые варьировали в разных линиях, но все, без исключения, снижали уровень репликации вируса. И ДИ-частицы, и интерферон важны не только для установления, но и для поддержания персистенции. Тем не менее обнаружилось, что главную роль в поддержании персистенции играет отбор мутантов. В целом вирусы, выделенные из персистентно зараженных клеток, существенно отличаются от тех, которые использовали для заражения. Как правило, VSV, выделенные из персистентно зараженных клеток, образуют мелкие бляшки, реплицируются хуже, чем родительский штамм, и приобретают *ts*-фенотип. Хотя в ходе долговременной персистенции в вирусном геноме могут накапливаться сотни мутаций, отбору подвергаются мутанты с фенотипом РНК⁻, пока такой фенотип не становится преобладающим в вирусной популяции. Такие мутанты способны вызывать персистентную инфекцию при переносе в незараженную культуру даже в отсутствие интерферона или ДИ-частиц.

Принимая во внимание сложный механизм гибели клетки при рабовирусной инфекции, кажется вероятным, что персистентная инфекция отражает не нарушение специальной летальной функции вируса, а угнетение вирусных функций ниже уровня, необходимого для гибели клетки. До сих пор непонятно, почему в популяции вирулентного вируса отбору подвергаются частицы, дефектные по репликации. Хотя вирусы, выделенные при персистентной инфекции, чувствительны к температуре, клеточные культуры обычно ведутся при температурах, полностью перmissive для вирусов дикого типа и лишь полуперmissive для *ts*-мутантов. Тем не менее такие мутанты распространяются в культуре. Эксперименты по коинфекции показали, что *ts*-мутанты VSV способны подавлять репликацию вируса дикого типа, в то время как репликация самих мутантов лишь усиливается [50]. Эти результаты объясняют, почему *ts*-мутанты поддерживаются в популяции и даже пользуются

селективным преимуществом, но неизвестно, как это происходит на молекулярном уровне.

Изучение персистентно зараженных клеточных линий показало, что *in vitro* стандартный цитопатический характер взаимодействия между рабдовирусом и клеткой может быть изменен, однако все еще неясно, справедливо ли это для природных условий *in vivo*.

Литература

1. Bergmann J. E., Tokuyasu K. T., Singer S. J. (1981). Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1746—1750.
2. Blumberg B. M., Leppert M., Kolakofsky D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication, *Cell*, **23**, 837—845.
3. Capone J., Toneguzzo F., Ghosh H. P. (1982). Synthesis and assembly of membrane glycoproteins: Membrane anchoring COOH-terminal domain of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G contains fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **257**, 16—19.
4. Centrella M., Lucas-Lenard J. (1982). Regulation of protein synthesis in vesicular stomatitis virus-infected mouse L-929 cells by decreased protein synthesis initiation factor 2 activity, *J. Virol.*, **41**, 781—791.
5. Chanda P. K., Banerjee A. K. (1981). Identification of promoter proximal oligonucleotides and a unique oligonucleotide, pppGpC, from *in vitro* transcription products of vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **39**, 93—103.
6. Clinton G. M., Burge B. W., Huang A. S. (1978). Effects of phosphorylation and pH on the association of NS protein with the vesicular stomatitis virus cores, *J. Virol.*, **27**, 340—346.
7. Emerson S. U. (1982). Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome, *Cell*, **31**, 635—642.
8. Gibson R., Leavitt R., Kornfeld S., Schlesinger S. (1978). Synthesis and infectivity of vesicular stomatitis virus containing nonglycosylated G protein, *Cell*, **13**, 671—679.
9. Hamilton D. H., Moyer R. W., Moyer S. A. (1980). Characterization of the non-permissive infection of rabbit cornea cells by vesicular stomatitis virus, *Virology*, **49**, 273—287.
10. Holland J. J., Kennedy S. I. T., Semler B. L., Jones C. L., Roux L., Grabau E. (1980). Defective interfering RNA viruses and the host cell response. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 16, *Virus—Host Interactions*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 137—192, Plenum Press, New York.
11. Horikami S. M., Moyer S. A. (1982). Host range mutants of vesicular stomatitis virus defective *in vitro* RNA methylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7694—7698.
12. Hsu C.-H., Kingsbury D. W. (1982). NS phosphoprotein of vesicular stomatitis virus: Subspecies separated by electrophoresis and isoelectric focusing, *J. Virol.*, **42**, 342—345.
13. Hsu C.-H., Kingsbury D. W., Murti K. G. (1979). Assembly of vesicular stomatitis virus nucleocapsids *in vivo*: A kinetic analysis, *J. Virol.*, **32**, 304—313.
14. Hsu C.-H., Morgan E. M., Kingsbury D. W. (1982). Site-specific phosphorylation regulates the transcriptive activity of vesicular stomatitis virus NS protein, *J. Virol.*, **43**, 104—112.

15. Iverson L. E., Rose J. K. (1982). Sequential synthesis of 5'-proximal vesicular stomatitis virus mRNA sequences, *J. Virol.*, **44**, 356—365.
16. Johnson D. C., Schlesinger M. J., Elson E. L. (1981). Fluorescence photobleaching recovery measurements reveal differences in envelopment of Sindbis and vesicular stomatitis viruses, *Cell*, **23**, 423—431.
17. Kingsford L., Emerson S. U. (1980). Transcriptional activities of different phosphorylated species of NS protein purified from vesicular stomatitis virions and cytoplasm of infected cells, *J. Virol.*, **33**, 1097—1105.
18. Knipe D. M., Baltimore D., Lodish H. F. (1977). Separate pathways of maturation of the major structural proteins of vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **21**, 1128—1139.
19. Knudson D. L. (1973). Rhabdoviruses, *J. Gen. Virol.*, **20**, 105—130.
20. Kurilla M. G., Pownica-Worms H., Keene J. D. (1982). Rapid and transient location of the leader RNA of vesicular stomatitis virus in the nuclei of infected cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5240—5244.
21. Lazzarini R. A., Keene J. D., Schubert M. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses, *Cell*, **26**, 145—154.
22. Lentz T. L., Smith A. L., Crick J., Tignor G. H. (1981). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, **215**, 182—184.
23. Lodish H. F., Porter M. (1981). Vesicular stomatitis virus mRNA and inhibition of translation of cellular mRNA—Is there a P function in vesicular stomatitis virus? *J. Virol.*, **38**, 504—517.
24. Marcus P. I., Sekellick M. J. (1975). Cell killing by viruses. II. Cell killing by vesicular stomatitis virus: A requirement for virion derived transcription, *Virology*, **63**, 176—190.
25. Marcus P. I., Sekellick M. J., Johnson L. D., Lazzarini R. A. (1977). Cell killing by viruses. V. Transcribing defective interfering particles of vesicular stomatitis virus function as cell-killing particles, *Virology*, **82**, 242—246.
26. Marvaldi J., Sekellick M. J., Marcus P. I., Lucas-Lenard J. (1978). Inhibition of mouse L cell protein synthesis by ultraviolet-irradiated vesicular stomatitis virus requires viral transcription, *Virology*, **84**, 127—133.
27. Matlin K. S., Reggio H., Helenius A., Simons K. (1982). Pathway of vesicular stomatitis entry leading to infection, *J. Mol. Biol.*, **156**, 609—631.
28. McGowan J. J., Emerson S. U., Wagner R. R. (1982). The plus-strand leader RNA of VSV inhibits DNA-dependent transcription of adenovirus and SV40 genes in a soluble whole-cell extract, *Cell*, **28**, 325—333.
29. McGowan J. J., Wagner R. R. (1981). Inhibition of cellular DNA synthesis by vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **38**, 356—367.
30. Mifune K., Ohuchi M., Mannen K. (1982). Hemolysis and cell fusion by rhabdoviruses, *FEBS Lett.*, **137**, 293—297.
31. Miller D. K., Lenard J. (1981). Antihistaminics, local anesthetics, and other amines as antiviral agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3605—3609.
32. Nuss D. L., Koch G. (1976). Translation and individual host mRNAs in MPC-11 cells is differentially suppressed after infection by vesicular stomatitis virus, *J. Virol.*, **19**, 572—578.
33. Pringle C. R. (1975). Conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **69**, 85—116.
34. Reichman M. E., Schnitzlein W. H. (1979). Defective interfering particles of rhabdoviruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **86**, 124—168.
35. Reidler J. A., Keller P. M., Elson E. L., Lenard J. (1981). A fluorescence photobleaching study of vesicular stomatitis virus infected BHK cells. Modulation of G protein mobility by M protein, *Biochemistry*, **20**, 1345—1349.
36. Rothman J. E., Fine R. E. (1980). Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 780—784.
37. Schlegel R., Dickson R. B., Willingham M. C., Pastan I. H. (1982). Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and re-

- ceptor-mediated endocytosis of α_2 -macroglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2291—2295.
38. *Schlegel R., Tralka T. S., Willingham M. C., Pastan I.* (1983). Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell*, **32**, 639—646.
 39. *Schlegel R., Willingham M. C., Pastan I. H.* (1982). Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells, *J. Virol.*, **43**, 871—875.
 40. *Schmidt M. F., Schlesinger M. J.* (1980). Relation of fatty acid attachment to the translation and maturation of vesicular stomatitis and Sindbis virus membrane glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3334—3339.
 41. *Schnitzlein W. M., O'Banion M. K., Poirot M. K., Reichmann M. E.* (1983). Effect of intracellular vesicular stomatitis virus mRNA concentration on the inhibition of host cell protein synthesis, *J. Virol.*, **45**, 206—214.
 42. *Stanners C. P., Francoeur A. M., Lam T.* (1977). Analysis of VSV mutant with attenuated cytopathogenicity: Mutation in viral function, P. for inhibition of protein synthesis, *Cell*, **11**, 273—281.
 43. *Thomas J. R., Wagner R. R.* (1983). Inhibition of translation in lysates of mouse L cells infected with vesicular stomatitis virus: Presence of a defective ribosome-associated factor, *Biochemistry*, **22**, 1540—1546.
 44. *Wagner R. R.* (1975). Reproduction of rhabdoviruses. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 4, *Reproduction of Large RNA Viruses*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 1—93, Plenum Press, New York.
 45. *Weck P. K., Carroll A. R., Shattuck D. M., Wagner R. R.* (1979). Use of U. V. irradiation to identify the genetic information of vesicular stomatitis virus responsible for shutting of cellular RNA synthesis, *J. Virol.*, **30**, 746—753.
 46. *Weck P. K., Wagner R. R.* (1979). Vesicular stomatitis virus infection reduces the number of active DNA-dependent RNA polymerases in myeloma cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5430—5434.
 47. *Wilson T., Lenard J.* (1981). Interaction of wild-type and mutant M protein of vesicular stomatitis virus with nucleocapsids in vitro, *Biochemistry*, **20**, 1349—1354.
 48. *Wu F.-S., Lucas-Lenard J.* (1980). Inhibition of ribonucleic acid accumulation in mouse L cells infected with vesicular stomatitis virus requires viral ribonucleic acid transcription, *Biochemistry*, **19**, 804—810.
 49. *Youngner J. S., Preble O. T.* (1980). Viral persistence: Evolution of viral populations. In: *Comprehensive Virology*, Vol. 16, *Virus—Host Interactions*, ed. by H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, pp. 73—135, Plenum Press, New York.
 50. *Younger J. S., Quagliana P. O.* (1976). Temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus are conditionally defective particles that interfere with and are rescued by wild-type virus, *J. Virol.*, **19**, 102—107.
 51. *Zilberstein A., Snider M. D., Lodish H. F.* (1981). Synthesis and assembly of the vesicular stomatitis virus glycoprotein, *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, **46**, 785—795.

Орто- и парамиксовирусы и их репликация

Д. У. Кингсбери¹

Объединение в одну главу данных о структуре и репликации орто- и парамиксовирусов в значительной мере произвольно. По многим своим свойствам парамиксовирусы гораздо ближе к рабдовирусам, репликация которых обсуждалась в гл. 23. Однако уже из их названия (от греч. *туха* — *слизь*) становится ясно, что и орто-, и парамиксовирусы обладают особым свойством к мукополисахаридам и гликопротеинам (в частности, к клеточным рецепторам, содержащим сиаловую кислоту). Кроме того, вирусы обеих групп имеют сходные биологические свойства, а именно: способность агглютинировать эритроциты, наличие у некоторых представителей нейраминидазы, легкость культивирования в куриных эмбрионах и патогенность для органов дыхания (табл. 24.1). Все эти свойства указывают на эволюционное родство между орто- и парамиксовирусами.

Собирательный термин «миксовирусы» был предложен в 1955 г. Эндрюсом и др. [1] для вирусов гриппа А, В и С, вируса паротита (свинки) и вируса ньюкаслской болезни (NDV). Однако серологические исследования показали, что вирус паротита и NDV отличаются от вирусов гриппа, хотя и сходны с ними по антигенным свойствам [1, 37]. Дальнейшие исследования с применением электронной микроскопии с негативным контрастированием и других технических новшеств позволили разделить миксовирусы на две группы: ортомиксовирусы (вирусы гриппа) и парамиксовирусы (вирус паротита и NDV). При негативном контрастировании у вируса паротита и NDV выявился внутренний компонент в виде стержня с выраженной спиральной структурой (см. рис. 24.3, Б), в то время как у вирусов гриппа подобных структур не обнаружилось. В 1962 г. Уотерсон [71] привел еще несколько свидетельств в пользу существования принципиальных различий между миксовируса-

¹ *Kingsbury D. W.*, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee 38101.

Таблица 24.1. Сравнение свойств орто- и парамиксовирусов

Сходство		
Геном представлен одноцепочечной минус-РНК Имеется спиральный нуклеокапсид Имеется вирионная транскриптаза Имеется липидсодержащая оболочка Имеются поверхностные гликопротеины двух типов Способность к гемагглютинации (некоторые парамиксовирусы) Нейраминидазная активность (у парамиксовирусов и некоторых вирусов гриппа) Слияние оболочки вириона с клеточной мембраной, для которого необходимо протеолитическое расщепление вирусного гликопротеина Патогенны в основном для органов дыхания		
Различие		
Свойство	Ортомиксовирусы ¹⁾	Парамиксовирусы ²⁾
Организация генома	Сегментированный	Несегментированный
Место синтеза РНК	Ядро	Цитоплазма
Необходимость затравки для инициации транскрипции	Да	Нет
Число вспомогательных белков нуклеокапсида	3	2
Число неструктурных белков	3	1
Тип клеточной мембраны в месте слияния с оболочкой вириона	Эндосомная	Поверхностная
Уровень генетической рекомбинации	Высокий	Отсутствует
Скорость эволюции	Высокая	Низкая

¹⁾ На примере вируса гриппа А.²⁾ На примере вируса Сендай.

ми двух типов. Оказалось, что они различаются по внутриклеточной локализации антигенов, по чувствительности к препаратам, затрагивающим синтез белков и нуклеиновых кислот, и принципиальным образом различаются по генетическим свойствам (табл. 24.1). Ниже мы рассмотрим данные о молекулярных основах этих различий.

Сравнительный обзор двух семейств миксовирусов

В этом разделе мы рассмотрим (по возможности кратко и наглядно) те фундаментальные свойства, которые различаются у орто- и парамиксовирусов. Далее, основываясь на самых

последних данных, мы обсудим каждую из двух групп более детально. Поскольку некоторые особенности репликации парамиксовирусов сближают их с рабдовирусами (гл. 23), соответствующие разделы будут изложены весьма кратко.

Морфология

Подобно всем вирусам с негативным РНК-геномом, вирионы миксовирусов обоих типов содержат два структурных элемента: внутренний рибонуклеопротеин (или нуклеокапсид), составляющий сердцевину вириона и содержащий одноцепочечную геномную РНК, и наружную, близкую к сферической липопротеиновую оболочку (рис. 24.1—24.3). В среднем размер вириона вируса гриппа невелик (80—120 нм в диаметре), однако довольно часто, особенно в недавно выделенных штаммах, обнаруживаются протяженные нитевидные формы (рис. 24.1). Парамиксовирусы обычно имеют диаметр 150—250 нм; при этом описаны частицы большего размера, а также нитевидные формы. Такой плеоморфизм отражает относительную вариабельность почкования в процессе сборки вириона, что приводит к появлению вирусных частиц, содержащих два и более эквивалентов генома. Генетические последствия полиплоидии обсуждаются в гл. 7.

При негативном контрастировании поверхность миксовирионов выглядит неровной. Это объясняется наличием на ней гликопротеиновых комплексов (или «шипов»), имеющих стволотвидную форму и участвующих в присоединении вируса к клеточной поверхности и проникновении его в клетку. Вирусная оболочка достаточно прочна, чтобы защитить нуклеокапсиды от разрушения в процессе переноса из клетки в клетку, но, как правило, не выдерживает высушивания на сеточках для электронной микроскопии. Она спонтанно разрушается, при этом или нуклеокапсиды полностью высвобождаются, или контрастирующее вещество проникает внутрь вириона и очерчивает контуры нуклеокапсида. На рис. 24.1, А представлены результаты электронной микроскопии вируса гриппа, а на рис. 24.3, А — парамиксовируса.

Нуклеокапсиды миксовирусов обоих типов, как и хорошо изученного вируса табачной мозаики (TMV), обладают спиральной симметрией. Особенно четко она проявляется в случае парамиксовирусов, нуклеокапсиды которых благодаря большому размеру белковых субъединиц имеют «зубчатые» границы (см. рис. 24.3, Б). Нуклеокапсид закручен в спираль, напоминающую по форме винтовую лестницу, и ее центральная полость может быть заполнена контрастирующим веществом (см. рис. 24.3). Гибкость нуклеокапсидов парамиксовирусов зависит

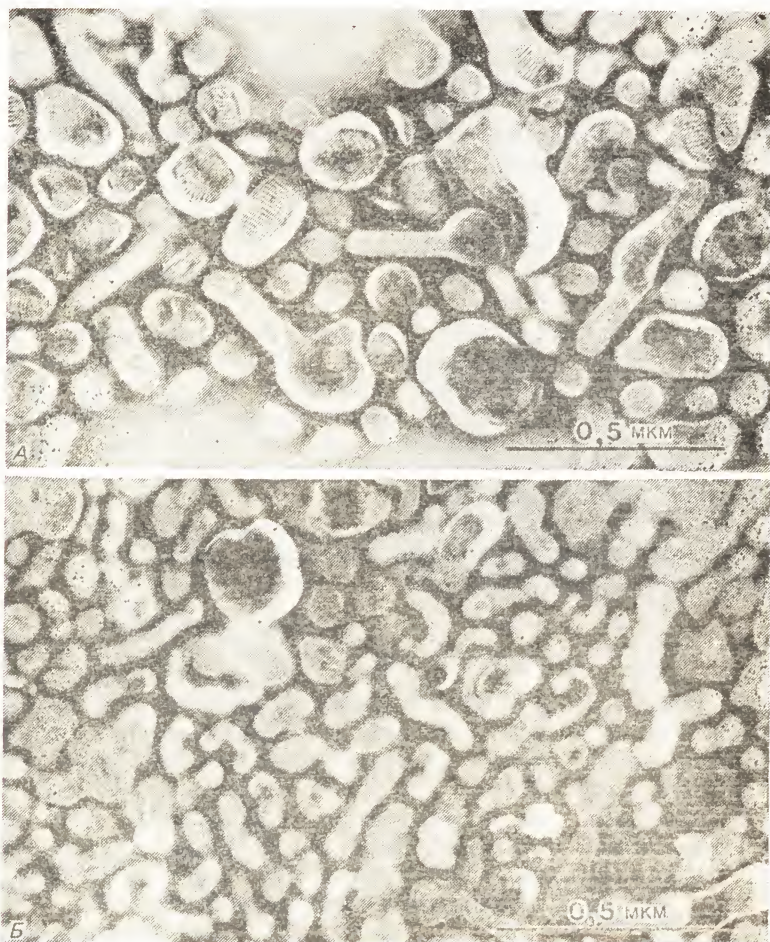


Рис. 24.1. Ультраструктура вирионов вируса гриппа (A/USSR/90/77), выявляемая с помощью негативного контрастирования [49]. А. Крупные спиральные структуры нуклеокапсидных сегментов, контуры которых очерчены проникшим в вирионы красителем. Б. Поверхностное окрашивание выявляет гликопротеиновые шипы. Обратите внимание на плеоморфизм вирионов и на нитевидные частицы, видимые на обеих фотографиях. (Микрофотографии любезно предоставлены К. Г. Мерти.)

от таких параметров, как ионный состав среды и pH [29]. Именно благодаря своей гибкости нуклеокапсиды обладают двумя важными свойствами. Во-первых, они могут сворачиваться в структуру, достаточно компактную для того, чтобы

уместиться в стандартной вирусной оболочке. Одна из таких структур показана на рис. 24.3, А. Она выявляется в результате проникновения фосфовольфрамовой кислоты в полую сердцевину нуклеокапсида, в данном случае вируса Сендай. Во-вторых, РНК в составе нуклеокапсида должна иметь возможность хотя бы какое-то время взаимодействовать с вирус-специфическими ферментами, которые используют ее в качестве матрицы (см. ниже). Создав такие внешние условия, при которых нуклеокапсид полностью утрачивает свою гибкость, легко определить отношение его полной длины к диаметру вириона (рис. 24.3, Б).

Геном парамиксовируса участвует в формировании одного нуклеокапсида и содержит полный набор из шести или более вирусных генов, ковалентно связанных друг с другом (см. рис. 24.15). Напротив, геном вируса гриппа сегментирован, при этом каждый ген располагается в отдельном сегменте (табл. 24.2). При определенных условиях комплексы сцеплен-

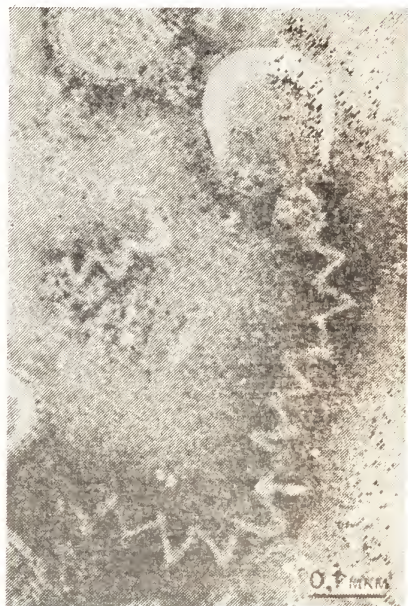
Таблица 24.2. Распределение кодирующих последовательностей по сегментам РНК вируса гриппа А

Номер сегмента ¹⁾	Кодируемый белок (белки)
1	PB2
2	PB1
3	PA
4	HA
5	NA
6	NP
7	M1, M2
8	NS1, NS2

¹⁾ Сегменты пронумерованы в порядке убывания молекулярной массы.

ных и инкапсидированных генных сегментов выходят из вирионов вируса гриппа (рис. 24.2) или выявляются внутри них с помощью негативного контрастирования (рис. 24.1, А). Эти комплексы образуют большие спирали, плотно уложенные внутри вириона (рис. 24.1, А) или же более растянутые (рис. 24.2). Они существенно отличаются от узких спиралей собственно нуклеокапсидных сегментов [30]. Последние довольно трудно рассмотреть на фотографиях, приводимых в большинстве статей, поскольку их контуры менее отчетливы, чем у нуклеокапсидных спиралей парамиксовирусов (рис. 24.3, Б). Структурные единицы нуклеокапсида вируса гриппа, состоящие из главного белка

Рис. 24.2. Крупная спиральная структура нуклеокапсида вируса гриппа (A/WSN/33), высвободившаяся из оболочки [49]. (Микрофотография любезно предоставлена К. Г. Мерти.)



нуклеокапсида, мельче, чем структурные единицы парамиксовирусов, а их положение по отношению к РНК не столь определено. РНК в составе нуклеокапсидов вируса гриппа легко гидролизуются рибонуклеазой вплоть до нуклеотидов. Следовательно, ассоциированные структурные белки или не связаны с РНК, или располагаются таким образом, что фосфодиэфирные связи РНК оказываются экспонированными. Напротив, белки нуклеокапсида парамиксовирусов полностью защищают ассоциированную с ними РНК от гидролиза рибонуклеазой.

Организация генома и вирусные белки

Для удобства мы выбрали вирус гриппа А как прототип ортомиксовирусов и вирус Сендай как прототип парамиксовирусов. Подробнее о вирусах гриппа В и С, а также о других парамиксовирусах см. соответствующие обзоры. Геном вируса гриппа А содержит 10 генов, распределенных по восьми сегментам РНК (табл. 24.2). Несмотря на столь явные отличия от вируса Сендай с его несегментированным геномом, оба они относятся к вирусам с негативным РНК-геномом, а их белковые продукты имеют много общего. Генетическая информация закодирована в негативном РНК-геноме в форме, комплементарной таковой для вирусной информационной РНК (мРНК).

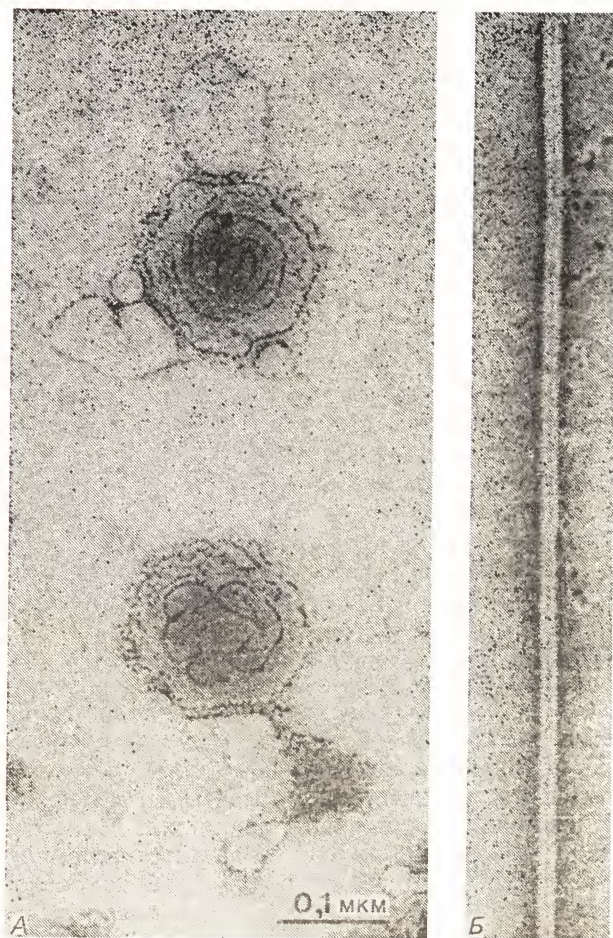


Рис. 24.3. Ультраструктура вирионов вируса Сендай, выявляемая с помощью негативного контрастирования. А. На поверхности двух вирионов выделяются гликопротеиновые шипы; скрученные нуклеокапсиды выявляются благодаря проникновению в вирионы контрастирующего вещества. Б. Вытянутый в длину нуклеокапсид. Увеличение в обоих случаях одинаковое. (Микрофотографии любезно предоставлены К. Г. Мерти.)

Поэтому геном негативной полярности должен транскрибироваться РНК-полимеразой с образованием позитивной мРНК. По некоторым данным клетки растений содержат РНК-зависимую РНК-полимеразу [65]; в то же время в клетках животных, где размножаются интересные нас вирусы, такая фермента-

тивная активность не обнаружена. Следовательно, вирусные гены должны кодировать особые белковые молекулы, способные транскрибировать негативные геномные РНК-матрицы.

Белки нуклеокапсида

В случае вируса гриппа А ферментативный аппарат синтеза вирусных РНК представлен Р-белками (от *polymerase*) — тремя наиболее крупными белковыми молекулами, кодируемыми тремя самыми крупными сегментами РНК. Эти белки представлены в нуклеокапсидах меньшим числом молекул, нежели структурный белок нуклеокапсида NP (от *nucleoprotein*), кодируемый пятым сегментом РНК.

У парамиксовирусов ферменты синтеза РНК кодируются меньшим числом генов, что отражает меньшую сложность транскрипционного механизма. В случае вируса Сендай кандидатами на эту роль являются белки L (от *large*) и P (от *polymerase-associated*). У вируса Сендай белки L и P находятся в составе нуклеокапсида вместе со структурным белком, который, как и его аналог у вируса гриппа, обозначается NP.

Белки оболочки

Вирус гриппа кодирует три белка оболочки. Два из них являются поверхностными гликопротеинами и образуют выступающие наружу шипы, а третий представляет собой негликозилированный внутренний компонент, называемый М-белком (от *membrane*). Один из гликопротеинов, НА (от *hemagglutinin*), опосредует связывание вирусной частицы с клеточным рецептором. Кроме того, НА подвергается посттрансляционной активации и приобретает другую важную функцию, а именно облегчает слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной и проникновение нуклеокапсида в цитоплазму. Другой гликопротеин вируса гриппа, NA (от *neuraminidase*), обладает только ферментативной активностью и отщепляет концевой остаток сиаловой (N-ацетилнейраминной) кислоты от любой олигосахаридной цепи, имеющей такой остаток, включая собственные олигосахаридные цепи NA и НА. Возможная биологическая роль NA-активности обсуждается в разделе, посвященном сборке и высвобождению вирионов. Белки НА, NA и М вируса гриппа кодируются сегментами 4, 6 и 7 соответственно (табл. 24.2).

В отличие от некоторых других парамиксовирусов вирус Сендай содержит также нейраминидазу [12]. При этом ферментативная активность ассоциирована с тем же гликопротеином, который ответствен за агглютинацию эритроцитов

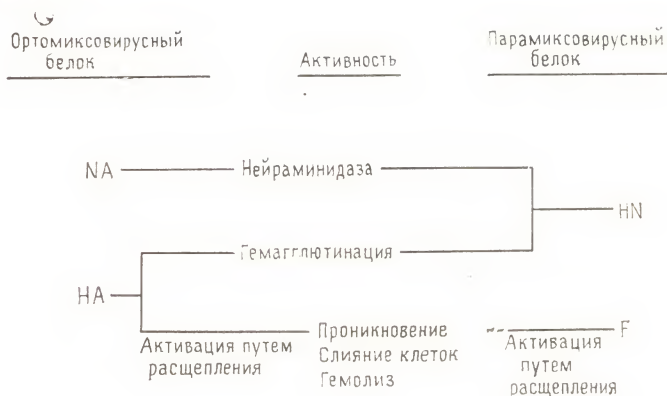


Рис. 24.4. Распределение функций между гликопротеинами оболочки у ортомиксовирусов (слева) и парамиксовирусов (справа). Гемолиз является следствием слияния. (Из работы [61] с разрешения авторов.)

и узнавание клеточного рецептора. Поэтому гликопротеин вируса Сендай был обозначен HN (от *hemagglutinin-neuraminidase*). Приобретя нейраминидазную активность, HN утратил свойственную HA вируса гриппа способность индуцировать слияние. Вместо него эту функцию выполняет второй гликопротеин F₀ (от *fusion*). Как и в случае гликопротеина HA, слияние осуществляется только активированным F₀, подвергшимся протеолитическому расщеплению. На рис. 24.4 схематически представлено распределение трех важнейших функций миксовирусов (узнавание рецептора, слияние и нейраминидазная активность) между молекулами гликопротеинов каждого вируса [61]. Как и в случае вируса гриппа, у вируса Сендай есть третий белок оболочки; он также негликозилирован и называется М-белком (от *membrane*).

Неструктурные белки

Вирус гриппа кодирует также три неструктурных белка. Один из них, М2, кодируется, как и М-белок (далее обозначаемый М1), седьмым сегментом РНК. В действительности гены М1 и М2 частично перекрываются в пределах одного и того же участка РНК, а их дифференциальная экспрессия регулируется по механизму сплайсинга, к обсуждению которого мы еще обратимся. Аналогично белки NS1 и NS2 (от *nonstructural*) кодируются перекрывающимися рамками считывания в восьмом сегменте РНК. У вируса Сендай обнаружен низкомолекулярный неструктурный белок, названный С-белком.

Репликация ортомиксовирусов

Присоединение вируса к клеточной поверхности и проникновение в клетку

Белок НА вируса гриппа весьма хорошо изучен как в структурном, так и в функциональном отношении. Это главный вирусный антиген, против которого направлены защитные антитела, и его вариабельность является основной движущей силой эволюции вируса, происходящей в ходе эпидемий. Некоторую информацию о структуре НА удалось получить с помощью прямого определения его аминокислотной последовательности. Однако полная первичная структура НА различных штаммов вируса гриппа А, а также некоторых штаммов вируса гриппа В была установлена только после применения методов молекулярного клонирования и быстрого секвенирования нуклеиновых кислот [41]. Полученные данные не только выявили степень родства между штаммами, но и были сопоставлены с расположением функциональных доменов и антигенных участков. Этому способствовало построение модели трехмерной структуры молекулы НА. НА — первый мембранный белок, чья структура была установлена методом рентгеноструктурного анализа.

Мы рассмотрим структуру и функции НА последовательно, начав с анализа первичной структуры. Возьмем в качестве примера НА вируса А/Aichi/68 (H3). На его карте можно отметить несколько значимых участков (рис. 24.5). На N-конце

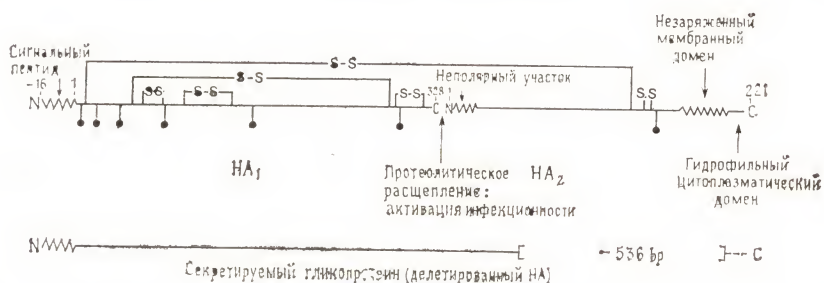


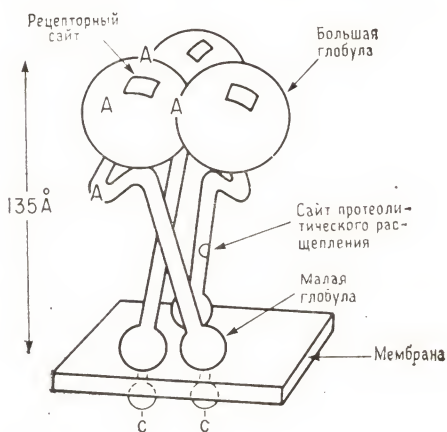
Рис. 24.5. Схематическое изображение первичной структуры НА-белка вируса гриппа [A/Aichi/68 (H3)] (из работы [42a] с разрешения авторов). Показан сайт протеолитического расщепления на фрагменты НА₁ и НА₂, в результате которого происходит экспонирование неполярного N-концевого сайта слияния во фрагменте НА₂. Отмечены также дисульфидные мостики (—S—S—), сайты присоединения углеводов (вертикальные черточки с черным кружком) и другие значимые области (см. текст). Внизу изображена секретируемая форма НА, полученная в результате генетических манипуляций и утратившая значительную часть карбоксильного конца (536 пар оснований в ДНК, кодирующей НА) [64].

расположен сигнальный пептид из 16 гидрофобных аминокислот. Эта короткая последовательность, типичная для мембранных гликопротеинов, ответственна за внедрение новосинтезированной полипептидной цепи в эндоплазматический ретикулум, но удаляется в ходе процессинга. Последующий участок из 550 аминокислот содержит субъединицу НА1 (328 остатков), один аргининовый остаток, удаляемый экзопептидазой после протеолитического расщепления на НА1 и НА2, и, наконец, субъединицу НА2 (221 остаток). НА1 и НА2 даже после расщепления остаются тесно связанными не только многочисленными нековалентными связями, но и дисульфидным мостиком между цистеином в 14-м положении НА1 и цистеином в 137-м положении НА2 (рис. 24.5). На рисунке указаны и другие дисульфидные мостики, участвующие в стабилизации третичной структуры. Молекула НА заякоривается в мембране карбоксильным концом НА2. При этом его гидрофобные остатки (со 185-го по 211-й) пронизывают липидный бислой, а последние 10 остатков, преимущественно гидрофильных, выступают в цитоплазму. По мере процессинга полипептида НА с образованием гликопротеина к определенным аспарагиновым остаткам с помощью долихолфосфата присоединяются олигосахаридные цепи [36].

Связь между первичной структурой белка и его трехмерной конфигурацией весьма сложна. Мы остановимся на этом вопросе лишь вкратце, а для более полного ознакомления с ним отсылаем читателя к оригинальной работе [72]. Каждый мономер НА, содержащий сцепленные субъединицы НА1 и НА2, образует структуру, состоящую из «стебля» длиной 80 Å, на одном конце которого находится большая глобулярная структура диаметром 40 Å, а у другого конца, заякоренного в мембране, — глобула диаметром 10 Å (рис. 24.6). В этой глобуле расположен N-конец НА1. Отсюда аминокислотная цепь идет по стеблю и, восемь раз круто изменив направление (не считая нескольких промежуточных петель), формирует большую глобулу. Далее полипептидная цепь НА1 возвращается назад по стеблю антипараллельно своей N-концевой области и заканчивается на расстоянии 20 Å от поверхности мембраны. Субъединица НА2 располагается в пределах стебля и маленькой глобулы на поверхности мембраны.

Каждый гликопротеиновый шип, различимый на электронных микрофотографиях вируса гриппа, представляет собой тример молекулы НА (рис. 24.6). Основные силы, стабилизирующие этот тример, приложены в области стебля, где молекулы повернуты друг к другу гидрофобными участками. Поэтому тример обладает большей стабильностью и жесткостью, чем составляющие его мономеры.

Рис. 24.6. Схематическое изображение тримера НА вируса гриппа A/Hong Kong/68 (H3). Указаны основные сайты антигенной изменчивости (А) и другие структуры, описанные в тексте. Толщина клеточной мембраны изображена не в масштабе рисунка, а уменьшена, с тем чтобы можно было изобразить С-концевые аминокислотные остатки, выступающие в цитоплазму. (Из работы [72], с изменениями.)



Участки взаимодействия с клеточными рецепторами локализируются в верхней части больших глобул. Здесь складки каждой белковой цепи образуют небольшой «карман», приспособленный для связывания сиаловой кислоты, входящей в состав гликопротеинового рецептора клетки-хозяина. Большая глобула, по-видимому, содержит также все сайты, участвующие в нейтрализации вируса; четыре основных известных на сегодня сайта расположены там, где аминокислотная цепь образует петли, выступающие из поверхности глобулы (рис. 24.6). Такие петли, очевидно, не влияют на четвертичную структуру шипов, поэтому в них могут накапливаться мутации, определяющие широкую антигенную вариабельность вирусов гриппа А.

Большинство олигосахаридных цепей присоединены к стеблю, повышая гидрофильность его наружной поверхности и увеличивая жесткость. Правда, три из семи олигосахаридных цепей, обычно присутствующих в молекуле НА, расположены в большой глобуле. Возможно, они участвуют во взаимодействии между тримером НА и рецепторами на клеточной поверхности.

К тому моменту, когда молекула НА в ходе вирусного биогенеза достигает поверхности зараженной клетки, она приобретает нужную конформацию, модифицируется всеми необходимыми олигосахаридными остатками и вместе с двумя другими мономерами формирует тример. При этом протеолитическое расщепление, приводящее к отделению НА1 от НА2, происходит вне клетки и осуществляется трипсиноподобными ферментами [43]. Эти протеазы в изобилии обнаруживаются в межклеточном пространстве дыхательных путей, в которых и реплицируется вирус гриппа. Их очень много как в куриных эмбрионах, так и в культуре клеток птиц. Однако вирус гриппа А может размно-

жаться также в культуре клеток млекопитающих, не обладающих протеазной активностью; в них образуются вирионы с нерасщепленным НА. Они способны нормально прикрепляться к клеткам-хозяевам и агглютинировать эритроциты, но неинфекционны. Следовательно, аминоконцевой фрагмент НА2, образующийся в результате процессинга, играет существенную роль на второй стадии инфекционного цикла — стадии слияния вирусной оболочки с мембраной клетки. После протеолиза N-конец НА2 обнаруживается на расстоянии 21 Å от С-конца НА1, что указывает на серьезные конформационные перестройки, которые претерпевает трехмерная структура молекулы НА. В ходе этого процесса N-конец НА2 отходит от стебля и становится доступным для взаимодействия с поверхностью зараженной клетки. 20 аминокислот, непосредственно примыкающих к появившемуся N-концу, представляют собой самую консервативную последовательность в составе НА и гомологичны сайту, образующемуся после протеолитической активации слитного белка F₀ вируса Сендай [21] (см. рис. 24.14). Гидрофобность этой последовательности облегчает ее внедрение в липидный бислой клеточной мембраны, что в свою очередь инициирует процесс слияния. Впрочем, детали этого процесса требуют уточнения. Наиболее загадочная особенность структуры НА — это удаленность N-конца НА2 (на расстояние 100 Å) от сайта связывания рецептора в верхней части мономера и близость его (до 35 Å) к поверхности вирусной оболочки (рис. 24.6). Возможно, после прикрепления к клеточному рецептору структура НА претерпевает дополнительную существенную перестройку, в результате которой N-конец НА2 начинает контактировать с липидным бислоем клеточной мембраны. Эта перестройка может индуцироваться низким значением pH во внутриклеточных везикулах (эндосомах), которые транспортируют инфекционный вирион в клетку [34, 62].

Другой главный гликопротеин вируса гриппа, нейраминидаза (NA), по-видимому, функционирует на совсем другой стадии жизненного цикла вируса, когда дочерние частицы высвобождаются из зараженной клетки. Поэтому данные о его структуре и функции мы рассмотрим ниже.

Транскрипция и трансляция

Механизм транскрипции у вируса гриппа уникален, поскольку предусматривает специфическую кооперацию вирусных и клеточных факторов. Здесь мы имеем дело с вирусом, содержащим негативный РНК-геном, транскрипция которого осуществляется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой, функционально сходной с РНК-транскриптазами других вирусов с негативной РНК, в том числе и парамиксовирусов. Однако в отличие от них

транскриптаза вируса гриппа не способна ни инициировать синтез мРНК, ни модифицировать ее 5'-конец с помощью экпирования и присоединения метильной группы. Поэтому она использует экпированный и метилированный 5'-конец клеточной мРНК, которая синтезируется клеточным ферментом РНК-полимеразой II.

Первые указания на эту уникальную особенность были получены более 25 лет назад с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Оказалось, что внутренний антиген вируса гриппа, называемый теперь NP-белком, вначале накапливается в клеточном ядре [8] в отличие от антигенов парамиксовирусов, накапливающихся в цитоплазме [66]. Позже были получены и биохимические данные в пользу того, что репликация вируса гриппа протекает в ядре. Выяснилось, что актиномицин D, ингибитор транскрипции ДНК, подавляет также репликацию вирусной РНК [3]. В отличие от ортомиксовирусов парамиксовирусы к актиномицину D нечувствительны. Зависимость размножения вируса гриппа от функционирования клеточной ДНК получила подтверждение и в опытах с УФ-облучением, в результате которого клетка становится непермиссивной для репликации вируса [59]. И наконец, исчерпывающие результаты были получены с использованием α -аманитина, ингибитора РНК-полимеразы II. Оказалось, что этот токсин подавляет репликацию вируса гриппа, но не других РНК-содержащих вирусов [44].

Представление о РНК-полимеразе II как о клеточном факторе, необходимом для инициации транскрипции вируса гриппа, нашло подтверждения и в опытах с применением динуклеотидов ApG и GrG. Эти специфические динуклеотиды заметно стимулируют способность вирионных нуклеокапсидов синтезировать РНК *in vitro* [47]. Они оказываются включенными в 5'-концевые участки вирусных транскриптов, т. е. выполняют функцию затравок для синтеза РНК. Следующим звеном в цепи доказательств стало обнаружение неспособности очищенных вирионов вируса гриппа осуществлять ферментативные реакции экпирования и метилирования, хотя у мРНК вируса гриппа, выделенной из зараженных клеток, 5'-конец метилирован [51].

В 1978 г., основываясь на этих данных, Р. Круг и др. [5] предположили, что для синтеза вирусных мРНК необходима экпированная и метилированная затравка, источником которой служит РНК, синтезированная РНК-полимеразой II. Эта гипотеза получила серьезное подтверждение, когда удалось показать, что очищенная β -глобиновая мРНК, подобно динуклеозидмонофосфатной затравке, стимулирует транскрипцию в разрушенных вирионах. Полученные результаты становятся особенно убедительными, если учесть, что в пересчете на молярные концентрации β -глобиновая мРНК является в 1000 раз более активным индуктором, чем ApG. Далее, Круг и др. показали, что, во-первых,

хорошими затравками являются также многие мРНК с метилированным 5'-концом, во-вторых, гуаниловый остаток в составе кэпа должен быть метилирован по седьмому положению, в-третьих, в состав вирусных мРНК включаются лишь первые 10—15 нуклеотидов с 5'-конца мРНК-затравки и, наконец, в-четвертых, этот механизм действительно реализуется в зараженной клетке, а не представляет собой артефакт экспериментов *in vitro* [10].

Впоследствии именно в лаборатории Круга было получено большинство известных на сегодня данных, касающихся инициации транскрипции у вируса гриппа. Первая стадия реакции — это гидролиз вирусной эндонуклеазой донорной мРНК на расстоянии 10—13 нуклеотидов от кэпа [52]. В отличие от продуктов обычного рибонуклеазного гидролиза, у которых на 3'-конце находится фосфатная группа, продукты гидролиза вирусной эндонуклеазой содержат на 3'-конце гидроксильную группу. Поэтому полученные олигонуклеотиды могут служить затравками, не подвергаясь дефосфорилированию. Для гидролиза вирусной эндонуклеазой в состав кэпа должен входить метилированный по положению 7 гуаниловый остаток, а предпочтительный сайт гидролиза находится с 3'-стороны от пуринового основания, как правило А. Преимущественное использование аденилового остатка неслучайно, поскольку 3'-концевым нуклеотидом во всех вирионных РНК (вРНК) является комплементарный ему остаток У. Следующая стадия — осуществляемое вирусной транскриптазой присоединение к затравке гуанилового остатка, который спаривается с предпоследним цитидиловым остатком вирионной РНК (рис. 24.7). Последующая элонгация транскрипта осуществляется вирионной транскриптазой. Заканчивается транскрипция за 15—22 нуклеотида до конца матрицы, где олигоуридиловая последовательность служит сигналом для нематричного присоединения полиадениловой последовательности (рис. 24.7).

Имеются кое-какие сведения и об индивидуальной роли каждого из трех белков Р в процессе транскрипции. Основным источником информации послужили эксперименты по УФ-индуцированному сшиванию аминокислот и нуклеотидов, пространственно сближенных в результате белок-нуклеинового взаимодействия [67].

Остановимся вначале на номенклатуре Р-белков. Все они имеют сходную молекулярную массу, поэтому их довольно трудно разделить с помощью одномерного гель-электрофореза. Гораздо лучшее разрешение удастся получить при двумерном разделении, когда в одном направлении проводят изоэлектрофокусирование, а в другом — электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 24.8). При этом два основных белка РВ1 и РВ2 (перечисленные в порядке убывания их молекулярной массы) отделяют-

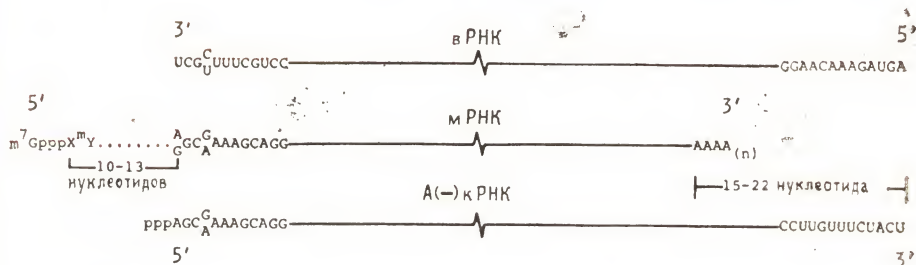


Рис. 24.7. Общие для всех сегментов вирионной РНК вируса гриппа А (вРНК) концевые нуклеотидные последовательности; концевые последовательности, свойственные вирусным транскриптам (мРНК); комплементарные цепи, служащие матрицей для сегментов РНК [A(-)кРНК]. мРНК включает 5'-концевую экпированную затравку длиной 10—13 нуклеотидов и 3'-концевую полиадениловую последовательность (AAAA_n). (Из работы [42а] с разрешения авторов.)

ся от Р-белка (РА), который у большинства штаммов вируса гриппа имеет промежуточную электрофоретическую подвижность. Как показали опыты по сшиванию, с экпированными нуклеотидами связывается РВ2 [67]. Роль РВ2 в узнавании экпа подтвердилась в опытах с использованием *ts*-мутантов [68]. Опыты по сшиванию показали также, что РВ1 связывается с первым присоединяемым к затравке гуаниловым остатком; следовательно, он, вероятно, содержит активный центр, участвующий в элонгации цепи РНК [67]. Никаких сведений о взаимодействии РА с нуклеотидными субстратами в этих опытах получено не было; роль этого белка остается неясной. Тем не менее по последним

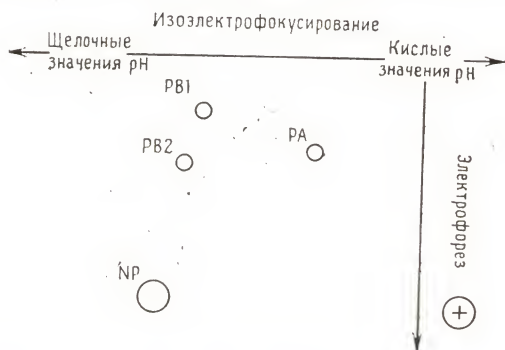


Рис. 24.8. Двумерное разделение нуклеокапсидных белков вируса гриппа. Сначала проводят изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле, а затем белки разделяют методом электрофореза в сильно денатурирующих условиях (додecilсульфат натрия и восстанавливающий агент). Белки мигрируют к аноду (+) тем быстрее, чем меньше молекулярная масса. (Из работы [32а], с изменениями.)

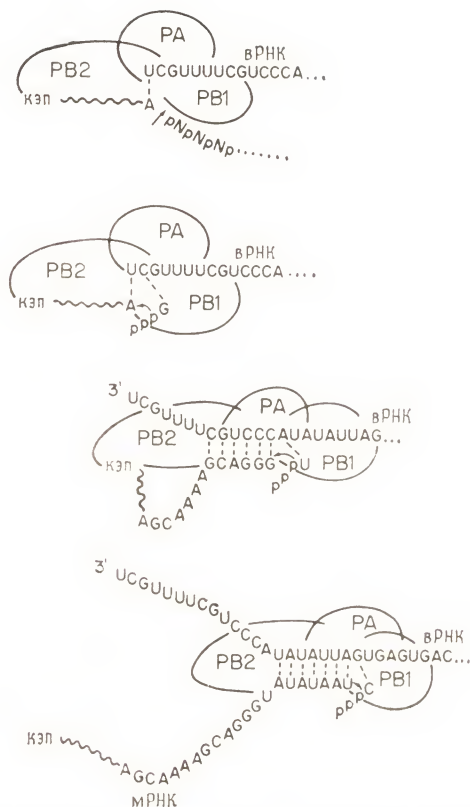


Рис. 24.9. Модель функционирования, взаимодействия и перемещения трех Р-белков на начальных стадиях синтеза мРНК вируса гриппа. Представлены последовательности вРНК и мРНК гена NP (пятый сегмент). *Сверху вниз*: связывание PB2 с 5'-концевым кэпом гетерологичной РНК сопровождается эндонуклеазным расщеплением по пуриновому основанию (обычно А), отстоящему от 5'-конца на 10—13 нуклеотидов. Далее PB1, используя вРНК как матрицу, присоединяет к затравке первый гуаниловый остаток и продолжает копировать матрицу. Все три Р-белка, по-видимому, перемещаются по матрице вместе. PB2 и кэп разъединяются после удлинения затравки на 11—15 нуклеотидов. (Из работы [6] с разрешения авторов.)

данном все три белка образуют комплекс, который в процессе элонгации транскрипта перемещается вдоль матрицы [6]. Есть любопытные сведения о том, что PB2 не отсоединяется от кэпа до тех пор, пока транскриптазный комплекс не переместится по меньшей мере на 10 нуклеотидов от конца затравки (рис. 24.9).

Снабжение транскрипционного аппарата вируса гриппа *in vivo* необходимыми затравками сопряжено, по-видимому, с про-

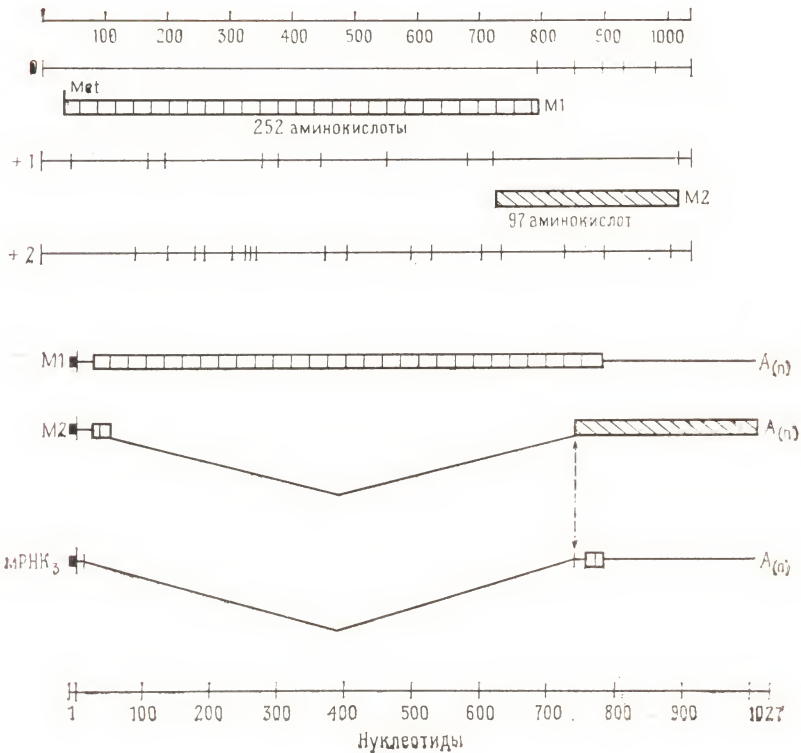


Рис. 24.10. *Вверху.* Карта белок-кодирующих участков в седьмом сегменте РНК вируса гриппа А. На карте отмечено число нуклеотидов, начиная от 5'-конца позитивной (белок-кодирующей) цепи. Терминирующие кодоны во всех трех возможных рамках считывания отмечены вертикальными линиями. Две открытые рамки (0, +1) обозначены заштрихованными прямоугольниками. *Внизу.* Схематическое изображение трех мРНК, специфичных для седьмого сегмента. Тонкие линии — это некодирующие последовательности на 5'- и 3'-концах мРНК. V-образные линии — сплайсируемые участки (интроны). Черные прямоугольники перед первым с 5'-конца нуклеотидом — гетерологичные последовательности, заимствованные у клеточных РНК (экспонированные затравки). Обратите внимание, что предсказанный пептид М3, кодируемый мРНК₃, имеет ту же рамку считывания, что и белок М1. (Из работы [42а] с разрешения авторов.)

должающимся синтезом гетерогенных ядерных РНК — предшественников клеточных мРНК. В вирусные мРНК включаются метилированные кэпы только тех клеточных мРНК, которые синтезировались после, но не до заражения: вирусная транскрипция прекращается вскоре после ингибирования клеточной транскрипции актиномицином D или α -аманитином. Возможно, в качестве

затравки используются новосинтезированные клеточные транскрипты, но не исключено, что затравками являются и более зрелые процессированные формы, еще не покинувшие ядро.

В транскрипции вируса гриппа участвует еще одна связанная с ядром активность — метилтрансферазная, модифицирующая внутренние адениловые остатки, а также активность, осуществляющая сплайсинг мРНК. Как уже упоминалось, седьмой и восьмой сегменты РНК вируса гриппа кодируют по два белка. В седьмом сегменте кодируется с открытой рамкой считывания, отстоящей на 25 нуклеотидов от 5'-конца мРНК, негликозилированный белок оболочки М1 (рис. 24.10). мРНК для белка М1 представляет собой практически полный транскрипт седьмого сегмента. Меньший белок М2, кодируемый седьмым сегментом, соответствует рамке, сдвинутой вправо на один нуклеотид и отстоящей от 3'-конца более чем на 700 нуклеотидов. Однако у М2-мРНК и М1-мРНК на 5'-конце имеются совпадающие последовательности из 51 нуклеотида, которые содержат инициаторный кодон и кодоны для первых девяти аминокислот. Эти аминокислоты у белков М1 и М2 одинаковы. Следующие 689 нуклеотидов в составе М2-РНК сплайсируются, в результате чего 51-й нуклеотид оказывается рядом с 740-м. Функция белка М2 не изучена: в составе вирусных частиц он не обнаружен. Третий продукт, который мог бы кодироваться седьмым сегментом РНК, представляет собой очень маленький пептид М3, не обнаруживаемый ни в вирионах, ни в зараженных клетках. Тем не менее соответствующую мРНК удастся выявить (рис. 24.10).

Аналогичным образом синтезируются два белка, кодируемые восьмым сегментом РНК (рис. 24.11). Белку NS1 отвечает непрерывная открытая рамка считывания; его мРНК соответствует по размеру вирионной РНК-матрице. Меньший белок NS2 кодируется мРНК, в которой удалены нуклеотиды с 57-го по 528-й, а рамка считывания сдвинута вправо на один нуклеотид, начиная с нуклеотида 529. Ни один из продуктов гена NS не обнаруживается в вирионах; при этом NS1 накапливается в ядре и, возможно, выполняет функцию, связанную с синтезом вирус-специфических РНК. Теоретически можно представить, что М2- и NS2-мРНК образуются не по механизму ядерного процессинга и без помощи клеточных ферментов, например в результате «перепрыгивания» вирионной полимеразы через протяженные участки матрицы. Но последовательности в местах соединения сохраняющихся и делетируемых участков мРНК обнаруживают гомологию с консенсус-последовательностью, встречающейся на границе экзонов и интронов эукариотических генов, поэтому механизм сплайсинга представляется более вероятным [41].

Существуют данные в пользу того, что разнообразие мРНК вируса гриппа регулируется на уровне транскрипции. При этом

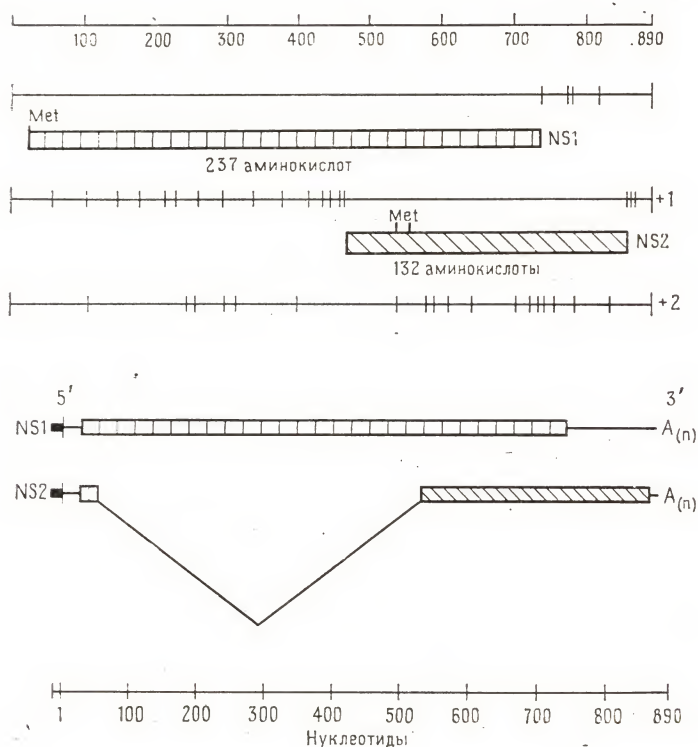


Рис. 24.11. Вверху. Схема белок-кодирующих участков в восьмом сегменте РНК вируса гриппа А. Масштаб и обозначения такие же, как на рис. 24.10. Внизу. Схематическое изображение двух мРНК, специфичных для восьмого сегмента. Обозначения такие же, как на рис. 24.10. (Из работы [42a] с разрешения авторов.)

мРНК, кодирующие внутренние белки, синтезируются предпочтительно на ранних стадиях инфекции, а мРНК, кодирующие поверхностные белки, — на значительно более поздних [28]. Изменение количества мРНК приводит к изменению количества соответствующих вирусных полипептидов. Следовательно, ключевую роль в регуляции играет дифференциальная транскрипция, а не изменения в уровне трансляции. Механизм такой дифференциальной экспрессии до сих пор неизвестен. Первичная транскрипция сегментов РНК, привносимых в составе вириона, скорее всего не регулируется, впрочем, как и аналогичная реакция *in vitro* [28]. Поэтому временные изменения в наборе РНК, считанных с вторичных матриц, объясняются или различной скоростью транскрипции разных сегментов РНК, или различной скоростью

репликации соответствующих сегментов вРНК [63], что в свою очередь ставит нас перед проблемой дифференциальной регуляции синтеза различных сегментов.

Репликация РНК

Транскрипция — наиболее важное из ранних событий инфекционного цикла вирусов с негативным РНК-геномом; на втором месте несомненно стоит другой процесс — репликация генома. У всех вирусов с негативным РНК-геномом репликация осуществляется вирус-специфическими белками. По-видимому, большинство (если не все) белков, ответственных за синтез сегментов мРНК вируса гриппа, участвуют и в репликации. Механизм, который регулирует альтернативное использование одного и того же набора белков (РВ1, РВ2, РА и NP), в деталях не изучен. Впрочем, можно себе представить, что его реализация зависит от концентрации одного или нескольких из этих белков. В начале инфекции, когда транскрипция только начинается, такие белки в свободной форме отсутствуют. И до тех пор, пока концентрация новосинтезированных белковых молекул, считанных с транскрибируемых мРНК, не достигнет критической, аппарат синтеза РНК будет работать на транскрипцию [4]. По достижении же критической концентрации один или несколько свободных нуклеокапсидных белков свяжутся с матрицей, продуктом или белковым компонентом транскрипционного комплекса и переключат аппарат синтеза с транскрипции на репликацию. Такой количественный контроль позволяет достичь равновесия между репликацией, с одной стороны, и транскрипцией новосинтезированных вРНК — с другой. Репликация ведет к сборке новых нуклеокапсидов, истощающей пул нуклеокапсидных белков; в результате их концентрация уменьшается до уровня, при котором происходит переключение аппарата синтеза с репликации на транскрипцию.

Первичным продуктом репликативного синтеза РНК являются комплементарные копии всех сегментов геномной РНК вируса гриппа [27]. Эти позитивные геномные копии отличаются от позитивных транскриптов (мРНК) структурой концевых последовательностей. В отличие от мРНК они не содержат экзпированных и метилированных затравочных последовательностей, и оба их конца строго комплементарны концам РНК-матриц; этим они отличаются от укороченных и полиаденилированных транскриптов (рис. 24.7). Следовательно, позитивный одноцепочечный антигеном, синтезированный на первых стадиях репликации, содержит в комплементарной форме всю генетическую информацию, записанную в каждом сегменте геномной РНК. Эти антигеномные сегменты РНК служат в свою очередь матрицами для синте-

за точных копий геномных сегментов. Как 3'-, так и 5'-концы всех сегментов вирусной РНК идентичны, поэтому аппарат синтеза РНК с равной эффективностью узнает любой сегмент.

Как и в случае вирусов с несегментированной негативной геномной РНК, геномы и антигеномы вируса гриппа никогда не обнаруживаются в свободном виде; они всегда инкапсидированы полным набором нуклеокапсидных белков. У вирусологов, изучающих такие вирусы, существует единое мнение, что неинкапсидированными РНК являются лишь мРНК, чья функция сводится только к тому, чтобы служить матрицами для синтеза вирусных белков. И наоборот, единственным классом вирусных РНК, способных служить матрицей для синтеза РНК (транскрипционного или репликативного), являются инкапсидированные молекулы [39]. Роль каждого из нуклеокапсидных белков вируса гриппа в процессе репликации все еще не изучена, однако эксперименты с условно-летальными (*ts*) мутантами показывают, что в этом процессе участвуют и PA, и PB1 [40, 45]. Роль белка PB2 пока неясна, но, по-видимому, он участвует исключительно в процессе транскрипции. Дело в том, что его функция состоит в узнавании кэпа, а для репликации РНК не нужны ни кэп, ни затравка.

Репликация и транскрипция РНК вируса гриппа осуществляются в ядре [31]. Как мы уже отмечали, скорость синтеза сегментов РНК изменяется во времени; впрочем, данных по этому вопросу явно недостаточно.

Генетические взаимодействия

Вирус гриппа стал первым выявленным патогенным вирусом человека и, более того, первым вирусом эукариот, который исследовали количественными генетическими методами [9]. В ранних опытах с использованием смешанной инфекции лабораторными штаммами с разной нейраминидазной активностью и разной патогенностью для мышей были выявлены частицы с признаками, характерными для обоих родительских штаммов, что свидетельствовало о наличии генетической рекомбинации. После того, как этот процесс был изучен применительно к другим вирусам животных, оказалось, что у вируса гриппа частота рекомбинации на порядок выше. Херст [32] предположил, что высокая частота рекомбинации объясняется сегментацией вирусного генома. Впоследствии его гипотеза нашла подтверждение в биохимических экспериментах [41]. Если заразить клетку двумя штаммами вируса гриппа, сегменты их реплицирующихся геномов будут смешиваться в любых сочетаниях, поэтому дочерние вирусные частицы будут содержать разные наборы генов, заимствованных от каждого из родителей. Такое комбинирование

сегментов вирусной РНК правильнее называть генетической перетасовкой (реассортацией), чтобы подчеркнуть его несоответствие традиционным представлениям о генетической рекомбинации, в ходе которой генетический материал, будь то ДНК или РНК, перестраивается или по механизму кроссинговера, или по механизму смены матрицы. Повышенная по сравнению с классической рекомбинацией частота генетической реассортации несомненно играет главную роль в высоком уровне изменчивости вирусов гриппа. В гл. 7 это обстоятельство рассматривается в связи с возникновением новых эпидемических штаммов вирусов гриппа А.

Для вирусов гриппа описана также внутрисегментная (генная) рекомбинация [58], однако частота ее столь низка, что роль этого процесса в природной изменчивости минимальна. Тем не менее полученные данные указывают на то, что репликативный аппарат вируса гриппа способен в ряде случаев отсоединяться от матрицы, с которой он был связан. Очевидно, в этих случаях происходит преждевременная терминация на исходной матрице и комплекс репликативных белков (репликаза) возобновляет синтез на другой, гомологичной цепи (механизм смены матрицы). Такая преждевременная терминация приводит к появлению различного рода мутантов. Например, возобновление синтеза может произойти не точно в сайте терминации, а на несколько нуклеотидов дальше. При этом независимо от того, используется ли для возобновления репликации исходная цепь или гомологичная ей, образуются делеционные мутанты. Делеционные мутанты, сохраняющие концевые последовательности, служащие сигналами инициации синтеза РНК, часто образуются у вирусов с негативным РНК-геномом. Они называются дефектными интерферирующими частицами (ДИ-частицами) (гл. 7). Их дефектность обусловлена утратой генетической информации для синтеза необходимых белков, а способность интерферировать с полноценным вирусом объясняется высоким сродством к ферментативному аппарату репликации. Пока для вируса гриппа описаны ДИ-РНК, являющиеся производными сегментов РНК с 1-го по 3-й. Однако нет оснований считать, что другие сегменты устойчивы к накоплению делеций. Примером того, насколько резкие изменения может претерпевать репликативный комплекс вируса гриппа, служит рекомбинантная ДИ-РНК, описанная Филдсом и Уинтером [17]. Она содержит пять разных участков из третьего сегмента и, кроме того, область длиной 60 нуклеотидов из первого сегмента. Несмотря на измененную внутреннюю структуру, такая РНК поддерживается в популяции, поскольку содержит на обоих концах последовательности стандартного вируса. Недавно было показано [11], что наиболее распространенные ДИ-РНК вирусов гриппа с одной внутренней делецией мо-

гут при наличии подходящей затравки и других факторов транскрибироваться *in vitro*. Следовательно, их концевые последовательности, ответственные за инициацию транскрипции, терминацию и полиаденилирование, функционируют нормально, как в составе стандартного вируса. Впрочем до сих пор неизвестно, продуцируются ли такие транскрипты зараженными клетками и играют ли они или соответствующие им белки какую-либо роль в интерференции, обусловленной ДИ-частицами.

Хотя молекулярные механизмы образования ДИ-частиц вируса гриппа установлены лишь недавно, сами частицы изучаются на протяжении многих лет [70]. Их удается обнаружить по отсутствию инфекционности, способности к интерференции и малым по сравнению со стандартными вирионами размерам. Кроме того, в генетических экспериментах и при изучении функций отдельных белков широко используют другие типы мутантов вируса гриппа. К ним относятся температурочувствительные (*ts*) и адаптированные к холоду (*ca*) условно-летальные мутанты, а также мутанты по кругу хозяев (*hr*). В принципе все эти мутанты можно получить в лабораторных условиях с помощью химического мутагенеза. Более того, в арсенале вирусологов и генетиков есть большое количество спонтанных мутантов, отобранных в ходе культивирования или обнаруженных в природе.

Технология рекомбинантных ДНК открывает новые замечательные возможности для дальнейшего изучения экспрессии генов и функционирования их белковых продуктов у самых разных организмов. Что касается вируса гриппа, то молекулярное клонирование позволило не только быстро накопить обширную информацию о первичной структуре всех вирусных генов (хотя, например, для НА-гена этот подход оказался наиболее продуктивным), но и конструировать *in vitro* определенные мутанты. В настоящее время гены, кодирующие белки НА, NA, М и NS, уже вводятся в составе бактериальных плазмидных векторов в эукариотические клетки, где и экспрессируют соответствующие полипептиды [20]. В этих опытах обычно используют плазмидные конструкции, несущие промоторы SV40, поэтому клеточные РНК-полимеразы II могут эффективно инициировать синтез РНК, содержащих генетическую информацию вируса гриппа. Правда, экспрессия носит обычно временный характер и ограничена цитопатическим эффектом. С другой стороны, интеграция НА-гена вместе с селективным маркером (таким, как клеточный ген тимидинкиназы) приводит к стабильной экспрессии [20].

С помощью искусственного мутагенеза получен делеционный вариант гена НА, утративший область, ответственную за синтез гидрофобного карбоксильного конца белковой молекулы. Этот гидрофобный домен относится к субъединице НА2 и заякоривает гемагглютинин в вирусной оболочке. Клетки, трансфицирован-

ные мутантным геном, продуцируют растворимую форму НА и секретируют его в культуральную среду [19]. Таким способом удалось подтвердить функцию гидрофобного С-конца и найти подход к получению растворимого гемагглютинина для вакцинации. НА-ген, встроенный в плазмиду, экспрессировали также в бактериальных клетках — альтернативном источнике антигена. Ко времени выхода этого издания мы наверняка получим много новых сведений о функционировании других белков вируса гриппа, а источником этих сведений станут генно-инженерные эксперименты с соответствующими генами.

Обсуждение генетики вируса гриппа было бы неполным без упоминания о гетерозиготности и фенотипическом смешивании (см. также гл. 7), хотя ни один из этих феноменов не имеет такого значения для эпидемиологии, как генетическая реассортация. Гетерозиготность появляется тогда, когда в вирусную частицу включаются дополнительные копии генных сегментов. Гетерозиготные вирионы можно выявить по их способности давать в каждом пассаже расщепление родительских признаков. Нитевидные формы вируса гриппа достаточно протяженны, чтобы в них могли поместиться два или более полных набора генных сегментов (феномен полиплоидии), а это создает условия для образования гетерозиготных частиц. Фенотипическое смешивание заключается в том, что вирионы содержат смесь белков, кодируемых геномами двух вирусов. Этот феномен наблюдается у многих вирусов и реализуется тогда, когда в одной клетке экспрессируются два разных вирусных генома. Иными словами, он подразумевает одновременное присутствие в клетке мРНК разных мутантов. Поскольку все вирусные мРНК моноцистронны, сегментированность генома вируса гриппа не имеет в данном случае особого значения.

Сборка и высвобождение вирионов

Подобно другим РНК-содержащим вирусам с оболочкой, вирионы вируса гриппа состоят из двух основных структур, которые собираются в разных местах: нуклеокапсид — внутри клетки, а оболочка — на плазматической мембране. Точнее, сборка оболочки начинается внутри клетки, на мембране эндоплазматического ретикулума, куда внедряются синтезирующиеся гликопротеины НА и NA. Мембранный аппарат обеспечивает их транспорт через комплекс Гольджи к клеточной поверхности, присоединение олигосахаридных цепей и их модификацию, формирование третичной структуры и окончательную укладку изолированных белковых молекул в тримеры НА и тетрамеры NA, которые и образуют «шипы» собирающихся и уже зрелых вирионов. Это обычный путь сборки оболочки РНК-содержащих виру-

сов, которому и будут посвящены оставшиеся разделы этой главы.

В отличие от других РНК-содержащих вирусов с наружной оболочкой нуклеокапсиды вируса гриппа, по всей видимости, собираются не в цитоплазме, а в ядре. При этом новосинтезированные нуклеокапсиды должны проделать путь от ядерной мембраны через цитоплазму к поверхности клеточной мембраны, где расположены вирусные гликопротеины. Пространство между нуклеокапсидом и новосинтезированной вирусной оболочкой заполняется М-белком. К сожалению, стадии взаимодействия М-белка с цитоплазматической поверхностью оболочки, с одной стороны, и нуклеокапсидом, с другой, все еще неизвестны. Нельзя также исключить, что белки нуклеокапсиды связываются с цитоплазматическими доменами гликопротеинов непосредственно, без участия М-белка. Кроме того, не выяснена роль М-белка и других компонентов оболочки в индукции процесса почкования.

Известно, что индивидуальные сегменты нуклеокапсиды упаковываются в вирион не беспорядочно, а так, как если бы они были соединены тандемно (рис. 24.2). Можно думать, что существует механизм, регулирующий набор сегментов, включающихся в каждый вирион. В то же время неясно, какие силы удерживают сегменты в тандеме. По-видимому, отбор сегментов РНК не опосредуется спариванием оснований, поскольку у всех сегментов РНК вируса гриппа концевые последовательности идентичны. Объединение определенных сегментов могло бы определяться взаимодействием между капсидными белками. Но и тогда не существует химической основы для отбора сегментов. Поэтому остается предположить, что тандемное расположение нуклеокапсидов, изображенное на рис. 24.2, есть результат произвольного комбинирования сегментов и что общее число сегментов, умещающихся в вирионе средних размеров, достаточно велико, чтобы заметная доля всех вирионов содержала по меньшей мере одну копию каждого гена [15].

Как уже упоминалось, белок NA вируса гриппа, второй вирусный гликопротеин, функционирует на поздних этапах цикла размножения. Этот белок, кодируемый шестым сегментом РНК, содержит в случае подтипа N2 (например, штамм A/Tokyo/3/67) 469 аминокислотных остатков (рис. 24.12). Белок имеет единственный гидрофобный участок (остатки с 7-го по 35-й), который заякоривает молекулу в вирусной оболочке. У белка NA гидрофобный якорь, наоборот, картируется в С-концевой области. N-концевое расположение якоря встречается реже, но все же описано для некоторых клеточных гликопротеинов. Ни N-концевая сигнальная последовательность, ни какой-либо другой участок в молекуле NA не подвергаются протеолитическому рас-

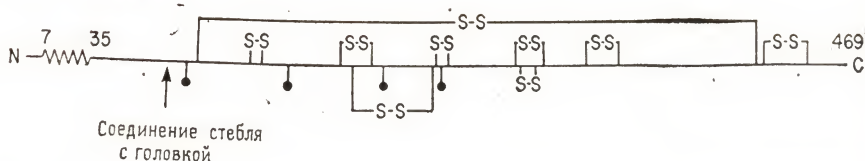


Рис. 24.12. Схематическое изображение первичной структуры НА вируса гриппа A/Tokyo/3/67 (N2) [69]. Зубчатая линия — домен, пронизывающий вирусную оболочку. Аминокислотные остатки 73–74 соответствуют месту соединения стебля с головкой. Остальные обозначения такие же, как на рис. 24.5.

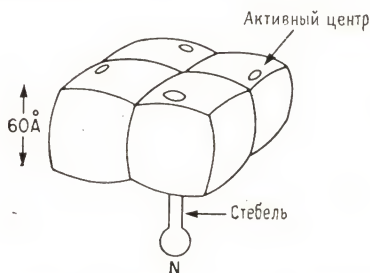


Рис. 24.13. Строение тетрамера НА вируса гриппа A/Tokyo/3/67 (N2) [69]. Показана кубическая головка, стебель и N-концевая область, заякоривающая всю структуру в вирусной оболочке. В двух последних доменах расположение четырех полипептидных цепей неизвестно. Каждая молекула НА содержит в своей верхней части активный центр.

цеплению. Как и в случае белка НА, молекула содержит несколько сайтов гликозилирования и множественные дисульфидные связи, стабилизирующие полипептидную цепь (рис. 24.12).

Молекулы НА формируют на поверхности вирусной оболочки тетрамерные шипы. В отличие от тримеров НА, напоминающих колонну, тетрамер НА представляет собой небольшой стебель, увенчанный кубической головкой (рис. 24.13). Стебель формируют аминокислотные остатки с 36-го по 73-й, а головку образует остальная часть молекулы. Головки, отделенные от вириона путем протеолитического расщепления стебля, исследовали с помощью рентгеноструктурного анализа [69]. Оказалось, что внутри головки полипептидная цепь формирует несколько витков, образующих шесть четырехцепочечных β -слоев. Каталитический центр нейраминидазы расположен на поверхности головки в каждой из субъединиц, поэтому тетрамер имеет четыре активных центра, подобно тому, как каждый тример гемагглютинина имеет три участка связывания рецептора. В головке расположены также все сайты гликозилирования НА, причем один из них, по-видимому, участвует во взаимодействии между мономерами. Изме-

нения антигенной структуры скорее всего ограничены петлями полипептидной цепи, соединяющими β -слои. Как и в случае НА, в таких петлях могут неограниченно накапливаться мутации, поскольку они не участвуют во взаимодействиях между β -цепями, формирующими каркас головки. Аминокислотные остатки вокруг каталитического центра также не вовлечены в образование β -структуры, но они консервативны, поскольку определяют ферментативную активность нейраминидазы [14].

НА вируса гриппа не столь важна для эволюции вируса, как НА, но тем не менее играет в ней заметную роль. Ферментативное действие нейраминидазы — отщепление концевых сиаловых кислот от олигосахаридных цепей в составе поверхностных белков и гликолипидов — распространяется на соседние молекулы НА и на любые оказавшиеся поблизости поверхностные гликопротеины. Не исключено, что активность нейраминидазы проявляется уже в ходе миграции через эндоплазматический ретикулум. Поэтому кластеры новосинтезированных белков вирусной оболочки, расположенные на клеточной мембране, содержат гликопротеины, лишенные остатков сиаловой кислоты. Такая модификация предохраняет дочерние вирусные частицы от агрегации, и в результате каждая из них ведет себя как самостоятельная инфекционная единица [50]. Агрегация, которая наблюдается после подавления активности НА, объясняется сродством гемагглютинина к сиаловой кислоте. Защита вирионов от агрегации — уже достаточное обоснование для существования нейраминидазы вируса гриппа. Однако фермент может выполнять в ходе инфекции и другие функции, например отделение вирусных частиц от ингибирующих инфекцию мукополисахаридов, находящихся в дыхательных путях. Другая возможная функция состоит в облегчении перемещения прикрепленного вируса к поверхности клетки путем высвобождения НА из комплекса с его рецептором [35].

Репликация парамиксовирусов

Присоединение вируса к клеточной поверхности и проникновение его в клетку

О поверхностных гликопротеинах парамиксовирусов известно гораздо меньше, чем о НА и НА вирусов гриппа. Объясняется это тем, что с медицинской точки зрения последствия гриппозной инфекции (особенно в период обширнейшей эпидемии 1918—1919 гг.) гораздо серьезней, чем последствия тривиальной парамиксовирусной. Это обстоятельство стимулировало более интенсивное изучение вирусов гриппа. Кроме того, поверхностные бел-

		5		10
		I		I
Вирус Сендай :	N-PHE-PHE-GLY-ALA-VAL-ILE-GLY-THR-ILE-ALA-LEU-GLY-			
SV5:	N-PHE-ALA-GLY-VAL-VAL-ILE-GLY-LEU-ALA-ALA-LEU-GLY-			
NDV:	N-PHE-ILE-GLY-ALA-ILE-ILE-GLY-GLY-VAL-ALA-LEU-GLY-			
Вирус гриппа А:	N-GLY-LEU-PHE-GLY-ALA-ILE-ALA-GLY-PHE-ILE-GLU-GLY-GLY-			

Рис. 24.14. Сопоставление N-концевой аминокислотной последовательности субъединицы F₁ трех парамиксовирусов с последовательностью субъединицы HA2 вируса гриппа A/PR/8/34 [21, 57]. Жирным шрифтом отмечены аминокислотные остатки, общие по крайней мере для двух парамиксовирусов. Курсивом выделены гомологичные аминокислотные остатки HA2 вируса гриппа.

ки парамиксовирусов в антигенном отношении гораздо более стабильны, поэтому в человеческих популяциях лица старшего возраста почти всегда иммунизированы. Белок HN (hemagglutinin-neuraminidase) осуществляет прикрепление вируса к клетке; при этом важным компонентом гликопротеинового (или, возможно, гликолипидного [46]) рецептора является сиаловая кислота. Присутствие в той же молекуле нейраминидазной активности не только отличает ее от гликопротеинов вируса гриппа, но и заставляет задуматься о топографии взаимодействия между активным центром нейраминидазы и сайтом связывания гемагглютинина. Портнер [53] представил данные об их пространственном разобщении, но для выявления деталей трехмерной структуры этой молекулы необходимо применение рентгеноструктурного анализа.

Вторым этапом заражения является слияние оболочки вириона с клеточной мембраной. У парамиксовирусов этот процесс осуществляется другим гликопротеином F. Форма-предшественник F₀ вне клетки подвергается протеолитическому расщеплению на большую субъединицу F₁, которая содержит новый гидрофобный N-конец (рис. 24.14), проникающий в клеточную мембрану, и меньшую нефункциональную субъединицу F₂, связанную с F₁ дисульфидным мостиком [57]. Все изложенное указывает на эволюционную связь между парамиксовирусами и вирусом гриппа. На этом, впрочем, аналогия между ними кончается. Вирионы вируса гриппа попадают в клетку в составе эндосом — внутриклеточных везикул с низким значением pH, изменяющим конформацию HA и облегчающим внедрение субъединицы HA2 в мембрану везикулы. При нейтральных значениях pH, характерных для межклеточного пространства, слияния с мембраной не происходит. Что касается вируса Сендай с расщепленным F-белком, то он осуществляет слияние мембран даже в таких условиях и именно поэтому часто используется как агент, стимулирующий слияние клеток, при получении клеточных гибридов [26]. Таким образом, вирус Сендай и другие парамиксовирусы проникают в клетку непосредственно через клеточную мембрану, без посред-

ничества эндосом, необходимых для проникновения вируса гриппа. Более подробно об этом свойстве парамиксовирусов и о соответствующих белках мы расскажем в разделе, посвященном сборке и высвобождению вирионов.

Транскрипция и трансляция

Стратегия репликации вирусов с негативным геномом была выявлена при изучении парамиксовируса: куриного вируса ньюкаслской болезни (NDV) [7, 38]. Как и вирус Сендай, NDV содержит высокомолекулярную одноцепочечную геномную РНК (рис. 24.15) с мол. массой около $5 \cdot 10^6$, что существенно превышает размер индивидуального сегмента РНК вируса гриппа. Изучение NDV-специфических РНК, синтезируемых в зараженной клетке, показало, что мол. масса большинства из них не превышает $1 \cdot 10^6$, т. е. скорее всего они являются вирусными мРНК. Молекулы РНК, имеющие размер генома, представлены существенно меньшим числом копий. Анализ нуклеотидного состава РНК-генома NDV выявил высокое содержание уридиловых остатков, в то время как предполагаемые мРНК характеризуются высоким содержанием остатков аденина. Это обстоятельство позволило предположить, что молекулы этих двух классов комплементарны; гипотеза получила подтверждение в опытах по гибридизации *in vitro* [7, 38]. Кроме того, РНК меньшего размера, комплементарные геномной РНК, транслировались *in vitro* с образованием вирусных белков, т. е. оказались истинными

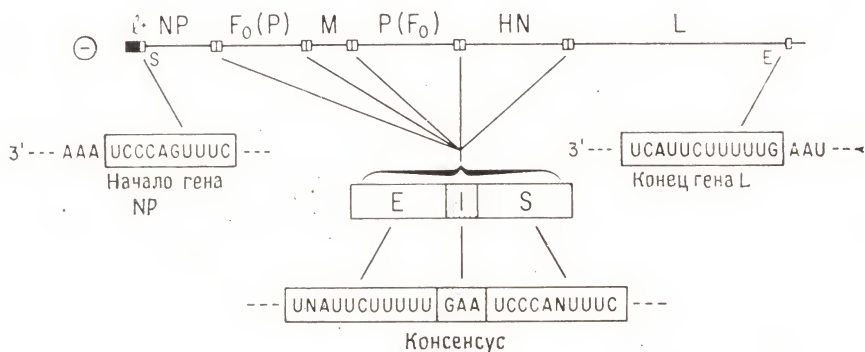


Рис. 24.15. Структура генома вируса Сендай. Отмечены положения гена позитивной лидерной РНК (+) и регуляторных элементов транскрипции на границах генов. Буквами E, I и S обозначены соответственно концы (включая сигнал полиаденилирования), межгенные области и стартовые последовательности. Скобки указывают на неопределенность в расположении генов P и F₀ [2]. (Из работы [25] и по неопубликованным данным Gupta, Re, Morgan, Kingsbury.)

мРНК. Позже обнаружилось, что сходную стратегию использует вирус везикулярного стоматита (VSV) — представитель семейства рабдовирусов [60]. Поскольку в культуре клеток VSV реплицируется более эффективно, чем любой из парамиксовирусов, а его вирионы содержат гораздо более активный и доступный для экспериментов *in vitro* аппарат транскрипции, фундаментальные аспекты биологии VSV изучены лучше, чем у парамиксовирусов (см. гл. 23).

Транскрипция канонического парамиксовируса, вируса Сендай, отличается от транскрипции сегментов РНК вируса гриппа по своей цитоплазматической локализации и соответственно по способности РНК-полимеразы инициировать транскрипцию в отсутствие экзогенной затравки и экпировать и метилировать 5'-конец транскрипта. Поскольку гены вируса Сендай тандемно сцеплены в составе единой цепи РНК (рис. 24.15), одной олигоуридилковой последовательности недостаточно для терминации транскрипции. Транскрипционный комплекс вируса гриппа может узнавать 5'-конец каждого сегмента, отстоящий на 13—17 нуклеотидов от олигоуридилковой последовательности, как составную часть сигнала терминации. В случае вируса Сендай, как впрочем, и VSV, олигоуридилковый участок, инициирующий 3'-концевое полиаденилирование, предваряется специфическим тетра nukлеотидом (AUAC у VSV, AUUC — у вируса Сендай) [25]. Вслед за *oligo(U)* идут неэкспрессирующиеся межгенные олигонуклеотиды GA (у VSV) или GAA (у вируса Сендай), а далее — консервативный сигнал инициации синтеза мРНК длиной около 10 нуклеотидов (K. C. Gupta, D. W. Kingsbury, неопубликованные данные), имеющий довольно низкую гомологию с соответствующим сигналом у VSV (рис. 24.15). Это тем более странно, если учесть гомологию в терминирующих сигналах, сайтах инициации полиаденилирования и межгенных последовательностях. По-видимому, различия в структуре сигналов инициации транскрипции отражают тот факт, что для транскрипции этих вирусов правильная терминация гораздо важнее, чем правильная инициация. Это обусловлено, вероятно, необходимостью антитерминации при репликации РНК этих вирусов.

Другие особенности транскрипции у вирусов Сендай и VSV сходны. К ним относятся полярность, проявляющаяся в том, что близость гена к 3'-концу генома определяет эффективность его транскрипции [22], функция 50-нуклеотидной лидерной последовательности, комплементарной 3'-концу генома, а также отсутствие трансляционного контроля за количеством вирусных белков.

Недавно обнаружено еще одно различие между представителями двух семейств вирусов с негативным несегментированным геномом. Оказалось, что в гене, кодирующем Р-белок, ассоциированный с полимеразной активностью вируса Сендай, присутст-

вует вторая открытая рамка считывания. Она кодирует небольшой неструктурный белок, названный белком С, и целиком расположена внутри гена Р. Но в отличие от транскрипции седьмого и восьмого сегментов РНК вируса гриппа, когда сплайсинг приводит к образованию мРНК разных классов, в данном случае отдельная мРНК для белка С не обнаружена. Предполагается, что одна и та же мРНК транслируется с образованием двух альтернативных белков [16].

О функции нуклеокапсидных белков вируса Сендай в регуляции транскрипции известно немного. L-Белок, близкий аналог белка L VSV, имеет достаточные размеры, чтобы выполнять функцию РНК-полимеразы, и, возможно, содержит активный центр этого фермента. Нельзя исключить также наличия в нем активных центров копирования и метилирования. Белок Р в вирионах вируса Сендай фосфорилирован в наибольшей степени [42] и, по-видимому, является аналогом фосфопротеина NS VSV, т. е. наряду с L-белком участвует в синтезе РНК. Белок NP скорее всего не обладает каталитической активностью, но, как уже упоминалось, его способность претерпевать конформационные изменения должна в процессе считывания матрицы РНК-полимеразой облегчать растягивание спирали.

Репликация РНК

Как мы уже отмечали, говоря о репликации РНК вируса гриппа, механизм, переключающий транскрипцию минус-цепей на их репликацию, принципиально важен, но до сих пор плохо изучен. В разделе, посвященном вирусу гриппа, мы упоминали о том, что транскрипция сегментов РНК заканчивается на расстоянии > 10 нуклеотидов от конца матрицы. Поэтому в ходе репликативного синтеза ключевую роль играет антiterминация, позволяющая РНК-полимеразе копировать *oligo(U)*-сигнал инициации полиаденилирования и последующие нуклеотиды. Для РНК-содержащих вирусов с несегментированным негативным геном антiterминация в ходе репликативного синтеза представляет собой еще более серьезную проблему. Дело в том, что для синтеза промежуточной матрицы — позитивного антигена — РНК-полимераза не должна обращать внимания на сигнальные последовательности на границе «лидер — ген NP», а кроме того, на границе всех последующих вирусных генов (рис. 24.15). Мы уже отмечали, что эволюционная консервативность сигналов терминации транскрипции у VSV и вируса Сендай указывает на важность этих нуклеотидных последовательностей для обеих РНК-полимераз. Правда, чтобы понять механизмы взаимодействия сигнальных последовательностей с комплексом полимераз-

ных белков, необходима более полная информация о структуре и функциональных возможностях белков Р и L.

Инициация синтеза РНК, будь то репликация или транскрипция, подразумевает наличие на 3'-конце негативной геномной РНК определенных сигнальных последовательностей. Здесь обнаружено несколько участков гомологии между РНК VSV и вируса Сендай. Кроме того, можно выявить еще несколько гомологичных участков, внося необходимые делеции или вставки [55, 56]. В соответствии с этими гомологиями лидерная РНК обоих вирусов обогащена U и обеднена G и C. Принимая во внимание также гомологии в терминирующих и межгенных последовательностях, можно считать, что VSV и вирус Сендай произошли от общего предка.

Генетические взаимодействия

Вирусы с несегментированным негативным геномом характеризуются гораздо меньшей изменчивостью, чем вирус гриппа. Одна из причин этого довольно очевидна: несегментированность генома делает невозможными пересортировки и перегруппировки, приводящие у вируса гриппа к появлению новых, доступных для тестирования и отбора генных комбинаций. Конечно, рекомбинация, основанная на механизме смены матрицы, по-прежнему возможна, и не только внутригенная, но и межгенная. Тем не менее, за исключением данных о существовании у негативных несегментированных вирусов ДИ-форм (см. ниже), все попытки обнаружить у парамиксовируса NDV классическую рекомбинацию не привели к успеху [23].

А что известно об изменчивости, обусловленной мутациями в кодирующих последовательностях? Как мы уже знаем, для НА и в меньшей степени для NA вируса гриппа характерен высокий уровень изменчивости; особенно сильно она выражена в тех областях третичной структуры, где аминокислотная цепь образует петлю, выступающую из структуры. Наоборот, за долгие годы не обнаружено никаких существенных изменений в белках HN и F парамиксовирусов, о чем, в частности, свидетельствует наличие стойкого иммунитета после инфекции или вакцинации вирусами кори и паротита. Незначительные изменения, конечно же, накапливаются и могут быть выявлены с помощью чувствительных зондов, например моноклональных антител. Но таких изменений, которые помогли бы вирусу обойти иммунологический контроль со стороны хозяина, как это периодически делает вирус гриппа, у парамиксовирусов не описано.

С учетом этих данных кажется парадоксальным тот факт, что против многих важных в медицинском отношении парамиксовирусов, таких как вирус парагриппа типов 1—4 или респира-

торно-синцитиальный вирус, до сих пор, несмотря на многочисленные попытки, не получены вакцины. Объясняется это тем, что поверхностные белки перечисленных вирусов, равно как и поверхностные белки патогенных для верхних дыхательных путей представителей неродственного семейства риновирусов, слабо иммуногенны (см. гл. 17, 18).

Почему же поверхностные белки парамиксовирусов не столь подвержены изменениям, как белки вируса гриппа? Можно было бы думать, что РНК-полимеразы парамиксовирусов делают меньше ошибок при считывании, чем соответствующий фермент вируса гриппа. Однако прямое определение уровня спонтанных мутаций не выявило различий между вирусами гриппа и Сендай [54]. Вообще говоря, вирусы с одноцепочечной РНК накапливают мутации с более высокой частотой, нежели вирусы с двухцепочечным геномом, в первую очередь потому, что у них отсутствует механизм коррекции по второй цепи. Из этого следует, что мутанты по белкам HN и F скорее всего появляются с той же частотой, что и мутанты по белкам HA и NA, но обладают пониженной жизнеспособностью. Объясняется это, возможно, тем, что большинство аминокислот в парамиксовирусных гликопротеинах играют структурную или функциональную роль и не могут быть замещены без утраты жизнеспособности вируса.

Фенотипическое смешивание и гетерозиготность обнаруживаются у парамиксовирусов столь же часто, как и у других вирусов, но носят скорее характер лабораторных курьезов (см. также гл. 7). Фенотипическое смешивание осуществляется даже между представителями разных семейств, когда их структура и способ репликации не слишком различаются. Примером тому могут служить парамиксовирусы и ортомиксовирусы [24] или рабдовирусы и парамиксовирусы [48]. Потомство, содержащее геном одного вируса в «овечьей шкуре» (оболочке) другого вируса, называют псевдотипами.

Основным классом условно-летальных мутантов, используемым для изучения функции парамиксовирусных генов, являются *ts*-мутанты. Низкий уровень рекомбинации не позволяет построить карту парамиксовирусов с помощью генетических методов. Однако информация о взаимном расположении генов была получена в серии экспериментов по прерыванию процесса транскрипции вследствие УФ-повреждения матриц [13], а также с помощью методов молекулярного клонирования и секвенирования [16]. Описаны, но не нашли широкого применения природные и безусловно-летальные мутации. Правда, спонтанный мутагенез можно исследовать с помощью моноклональных антител.

ДИ-частицы образуются в случае парамиксовирусов, видимо, с той же частотой, что и в случае VSV, но в деталях этот процесс изучен только для вируса Сендай. Так, описаны два класса

ДИ-частиц, первый из которых не отличался по принципам организации от ДИ-частиц VSV типа «застежка». Не обнаружено геномов вируса Сендай, где делеция затрагивала бы только ген L, как это бывает в РНК ДИ-частиц VSV типов LT и LT₂. Зато обнаружены другие делеционные мутанты, сохранившие, как и частицы класса LT, оба конца генома. Эти ДИ-РНК вируса Сендай содержат протяженные внутренние делеции, затрагивающие большинство структурных генов и оставляющие интактными только 3'-проксимальный фрагмент гена NP и 5'-проксимальный фрагмент гена L вместе с соответствующими концевыми последовательностями. Такие ДИ-частицы получили название слитных, поскольку потенциально они способны кодировать слитные белки, состоящие из N-конца NP и C-конца L. Правда, существование подобных белков или кодирующих их транскриптов до сих пор не доказано.

Сборка и высвобождение вирионов

Главное отличие морфогенеза парамиксовирусов от морфогенеза вируса гриппа состоит во внутриклеточной локализации сборки нуклеокапсидов. Для парамиксовирусов, как и для рабдовирусов, это цитоплазма. Отдельные стадии сборки, а также нерешенные проблемы морфогенеза были рассмотрены в гл. 23. Читатель должен только заменить обозначения белков (вместо N, NS и L в случае рабдовирусов NP, P и L для парамиксовирусов), и тогда все, изложенное в гл. 23, окажется применимым в данном случае.

Нейраминидазная активность, локализованная в белке HN, выполняет, очевидно, те же функции, что и активность NA вируса гриппа, а именно предотвращает агрегацию вирионов в результате связывания гемагглютинаина с сиаловой кислотой. Обратите внимание, что многие парамиксовирусы, такие как респираторно-синцитиальный вирус, вирус кори и другие представители родов *Pneumovirus* и *Morbillivirus*, лишены нейраминидазной активности, причем это не значит, что они не используют сиаловую кислоту для прикрепления к клетке. Именно с сиаловой кислотой они и связываются, но связывание носит более обратимый характер, чем в случае вирусов, имеющих нейраминидазу. Значит, и риск «застрять» на поверхности клетки для вируса без нейраминидазы меньше. Обратимое связывание с сиаловой кислотой на стадии первоначального взаимодействия с клеткой характерно для многих практически неродственных вирусов, и все они не нуждаются в нейраминидазе.

Изучая процесс проникновения парамиксовирусов в клетку, обнаружили, что вирионы могут сливаться с клеточной поверхностью при нейтральных значениях pH. На поздней стадии жиз-

ненного цикла, когда вирионы отпочковываются от поверхностной мембраны, эти участки мембраны оказываются усеянными шипами, состоящими из белков HN и F₀. Если в окружающей среде окажутся подходящие трипсиноподобные протеазы, молекулы F₀ на поверхности клетки активируются и индуцируют слияние клеточных мембран. Такой тип вирус-индуцированного слияния, названный *слиянием изнутри* [18], позволяет реплицирующемуся и транскрибирующемуся вирусу распространяться из клетки в клетку, успешно избегая действия циркулирующих противовирусных антител. Такие межклеточные слияния могут охватывать большое число клеток и приводить к образованию поликарионов (синцития). Последние наблюдаются не только в культуре клеток, зараженных респираторно-синцитиальным вирусом, получившим поэтому такое название. Образование синцития происходит и в организме хозяина, например при заражении вирусом кори. Предполагается, что вакцины на основе инаktivированных формальдегидом вирусов парагриппа и респираторно-синцитиального вируса неэффективны потому, что при инаktivации разрушается антигенная структура белков слияния. В результате организм остается незащищенным от вируса, распространяющегося путем межклеточного слияния [12]. Сейчас предпринимаются попытки сконструировать генно-инженерную вакцину на основе белков слияния парамиксовирусов. Возможно, эти попытки окажутся более успешными.

Заключение

Изучение фундаментальных различий молекулярно-биологических свойств вирусов гриппа и парамиксовирусов создает принципиальную основу для сопоставления важных в клиническом отношении признаков этих двух групп. Продолжается поиск более эффективных вакцин против вируса гриппа. Он основывается на огромном количестве информации, накопленной в последние годы. Прежде всего это касается структуры наиболее значимого поверхностного антигена HA, а также внутриклеточных событий, приводящих к появлению вирусного потомства. Главная проблема состоит в том, что современная технология приготовления вакцин не обеспечивает адекватного иммунного ответа, сравнимого по силе с иммунным ответом при естественной инфекции или при инфекции живыми аттенуированными вакцинными штаммами (гл. 17). Технология должна быть направлена на приготовление аттенуированных гриппозных вакцин, которые не ревертируют к патогенному вирусу дикого типа. Кроме того, необходимо уменьшить время между распознаванием нового типа HA, циркулирующего в популяции, и приготовлением соответствующей вакцины. Если учесть уровень наших фунда-

ментальных знаний в этой области и уровень развития биотехнологии, то обе проблемы не кажутся неразрешимыми.

Получены эффективные аттенуированные живые вакцины против вирусов кори и свинки. Что касается вирусов парагриппа и респираторно-синцитиального вируса, то для существенного повышения их иммуногенности нам следует изучить их поверхностные антигены так же хорошо, как НА и НА вируса гриппа. И снова наиболее эффективными, по-видимому, окажутся живые вакцины, а весьма важным компонентом защитного барьера организма — клеточный иммунный ответ.

В создании вирусных вакцин накоплен большой практический опыт. Поэтому поиск наиболее иммуногенных препаратов кажется нам многообещающим направлением борьбы с миксовирусными заболеваниями. В то же время открываются перспективы борьбы со специфическими и генерализованными вирусными болезнями с помощью химических веществ. Помимо интерферона могут быть найдены избирательные ингибиторы миксовирусных РНК-полимераз, не оказывающие побочного действия на клеточный метаболизм.

Литература

1. Andrewes C. H., Bang F. B., Burnet F. M. (1955). A short description of the myxovirus group (influenza and related viruses), *Virology*, **1**, 176—184.
2. Amesse L. S., Pridgen C. L., Kingsbury D. W. (1982). Sendai virus DI RNA species with conserved virus genome termini and extensive internal deletions, *Virology*, **118**, 17—27.
3. Barry R. D., Ives D. R., Cruickshank J. G. (1962). Participation of deoxyribonucleic acid in the multiplication of influenza virus, *Nature (Lond.)*, **194**, 1139—1140.
4. Bean W. J., Jr., Simpson R. W. (1973). Primary transcription of the influenza virus genome in permissive cells, *Virology*, **56**, 646—651.
5. Bouloy M., Plotch S. J., Klug R. M. (1978). Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4886—4890.
6. Braam J., Ulmanen I., Krug R. M. (1983). Molecular model of a eukaryotic transcription complex: Functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription, *Cell*, **34**, 609—618.
7. Bratt M. A., Robinson W. S. (1967). Ribonucleic acid synthesis in cells infected with Newcastle disease virus, *J. Mol. Biol.*, **23**, 1—21.
8. Breitenfeld P. M., Schäfer W. (1957). The formation of fowl plaque virus antigens in infected cells, as studied with fluorescent antibodies, *Virology*, **4**, 328—345.
9. Burnet F. M., Edney M. (1951). Recombinant viruses obtained from double infections with the influenza A viruses MEL and Neuro-WS, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **39**, 353—362.
10. Caton A. J., Robertson J. S. (1980). Structure of the host-derived sequences present at the 5' ends of influenza virus mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2591—2603.

11. Chanda P. K., Chambers T. M., Nayak D. P. (1983). In vitro transcription of defective interfering particles of influenza virus produces polyadenylic acid-containing complementary RNAs, *J. Virol.*, **45**, 55—61.
12. Choppin P. W., Richardson C. D., Merz D. C., Hall W. W., Scheid A. (1981). The functions and inhibition of the membrane glycoproteins of paramyxoviruses and myxoviruses and the role of the measles virus M protein in subacute sclerosing panencephalitis, *J. Infect. Dis.*, **143**, 352—363.
13. Collins P. L., Hightower L. E., Ball L. A. (1980). Transcriptional map for Newcastle disease virus, *J. Virol.*, **35**, 682—693.
14. Colman P. M., Varghese J. N., Laver W. G. (1983). Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, *Nature (Lond.)*, **303**, 41—44.
15. Compans R. W., Dimmock N. T., Meier-Ewert H. (1970). An electron microscopic study of the influenza virus-infected cell. In: *The Biology of Large RNA Viruses*, ed. by R. D. Barry and B. W. J. Mahy, pp. 87—108, Academic Press, London.
16. Dowling P. C., Giorgi C., Roux L., Dethlefsen L. A., Galantowicz M. E., Blumberg B. M., Kolakofsky D. (1983). Molecular cloning of the 3' proximal third of the Sendai virus genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5213—5216.
17. Fields S., Winter G. (1982). Nucleotide sequences of influenza virus segments I and 3 reveal mosaic structures of a small viral RNA segment, *Cell*, **28**, 303—313.
18. Gallaher W. R., Bratt M. A. (1974). Conditional dependence of fusion from within and other cell membrane alterations by Newcastle disease virus, *J. Virol.*, **14**, 813—820.
19. Gething M. J., Sambrook J. (1982). Construction of influenza virus hemagglutinin genes that code intracellular and secreted forms of the protein, *Nature (Lond.)*, **300**, 598—603.
20. Gething M. J., Sambrook J. (1983). Expression of cloned influenza virus genes. In: *Genetics of Influenza Viruses*, ed. by P. Palese and D. W. Kingsbury, pp. 169—191, Springer-Verlag, Vienna.
21. Gething M. J., White J. M., Waterfield M. D. (1978). Purification of the fusion protein of Sendai virus: Analysis of the NH₂-terminal sequence generated during precursor activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2737—2740.
22. Glazier K., Raghow R., Kingsbury D. W. (1977). Regulation of Sendai virus transcription: Evidence for a single promoter in vivo, *J. Virol.*, **21**, 863—871.
23. Granoff A. (1959). Studies of mixed infection with Newcastle disease virus. I. Isolation of Newcastle disease virus mutants and tests for genetic recombination between them, *Virology*, **9**, 636—648.
24. Granoff A., Hirst G. K. (1954). Experimental production of combination forms of virus. IV. Mixed influenza A—Newcastle disease virus infections, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **86**, 84—88.
25. Gupta K. C., Kingsbury D. W. (1982). Conserved polyadenylation signals in two negative-strand RNA virus families, *Virology*, **120**, 518—523.
26. Harris H., Watkins J. F. (1965). Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species, *Nature (Lond.)*, **205**, 640—646.
27. Hay A. J., Skehel J. J., McCauley J. (1982). Characterization of influenza virus RNA complete transcripts, *Virology*, **116**, 517—522.
28. Hay A. J., Lomniczi B., Bellamy A. R., Skehel J. J. (1977). Transcription of the influenza virus genome, *Virology*, **83**, 337—355.
29. Heggeness M. H., Scheid A., Choppin P. W. (1980). Conformation of the helical nucleocapsids of paramyxoviruses and vesicular stomatitis virus: Reversible coiling and uncoiling induced by changes in salt concentration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2631—2635.

30. *Heggeness M. H., Smith P. R., Ulmanen I., Krug R. M., Choppin P. W.* (1982). Studies on the helical nucleocapsid of influenza virus, *Virology*, **118**, 466—470.
31. *Herz C., Stavnezer E., Krug R. M., Gurney T.* (1981). Influenza virus, an RNA virus, Synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells, *Cell*, **26**, 391—400.
32. *Hirst G. K.* (1962). Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **27**, 303—308.
- 32a. *Horisberger M. A.* (1980). The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides, *Virology*, **107**, 302—305.
33. *Horne R. W., Waterson A. P., Widly P., Farnham A. E.* (1960). The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques, *Virology*, **11**, 79—98.
34. *Huang R. T. C., Rott R., Klenk H.-D.* (1981). Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells, *Virology*, **110**, 243—247.
35. *Huang R. T. C., Rott R., Wahn K., Klenk H.-D., Kohama T.* (1980). The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by myxoviruses, *Virology*, **107**, 313—319.
36. *Hubbard S. C., Ivatt R. J.* (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 555—583.
37. *Kilham L., Jungherr E., Luginbuhl R. E.* (1949). Antihemagglutinating and neutralizing factors against Newcastle disease virus (NDV) occurring in sera of patients convalescent from mumps, *J. Immunol.*, **63**, 37—49.
38. *Kingsbury D. W.* (1966). Newcastle disease virus RNA. II. Preferential synthesis of RNA complementary to parental viral RNA by chick embryo cells, *J. Mol. Biol.*, **18**, 204—214.
39. *Kingsbury D. W.* (1974). The molecular biology of paramyxoviruses, *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, **160**, 73—84.
40. *Krug R. M., Ueda M., Palese P.* (1975). Temperature-sensitive mutants of influenza WSN virus defective in virus-specific RNA synthesis, *J. Virol.*, **16**, 790—796.
41. *Lamb R. A.* (1983). The influenza virus RNA segments and their encoded proteins. In: *Genetic of Influenza Viruses*, ed. by P. Palese and D. W. Kingsbury, pp. 21—69, Springer-Verlag, Vienna.
42. *Lamb R. A., Choppin P. W.* (1977). The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells, III. Phosphorylation of polypeptides, *Virology*, **81**, 382—397.
- 42a. *Lamb R. A., Choppin P. W.* (1983). Gene structure and replication of influenza virus, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 467—506.
43. *Lazarowitz S. G., Goldberg A. R., Choppin P. W.* (1973). Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: Host cell activation of serum plasminogen, *Virology*, **56**, 172—180.
44. *Mahy B. W. J., Hastie N. D., Armstrong S. J.* (1972). Inhibition of influenza virus replication by α -amanitin: Mode of action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1421—1424.
45. *Mahy B. W. J., Barrett T., Nichol S. T., Penn C. R., Wolstenholme A. J.* (1981). Analysis of the functions of influenza virus genome RNA segments by use of temperature-sensitive mutants of fowl plague virus. In: *Replication of Negative Strand Viruses*, ed. by D. H. L. Bishop and R. W. Compans, pp. 379—394, Elsevier/North-Holland, New York.
46. *Markwell M. A. K., Svennerholm L., Paulson J. C.* (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5406—5410.

47. McGeoch D., Kitron N. (1975). Influenza virion RNA-dependent RNA polymerase: Stimulation by quanosine and related compounds, *J. Virol.*, **15**, 686—695.
48. McSharry J. J., Compans R. W., Choppin P. W. (1971). Protein of vesicular stomatitis virus and of phenotypically mixed vesicular stomatitis virus-simian virus 5 virions, *J. Virol.*, **8**, 722—729.
49. Murti K. G., Bean W. J., Jr., Webster R. G. (1980). Helical ribonucleoprotein of influenza virus: An electron microscopic analysis, *Virology*, **104**, 224—229.
50. Palese P., Tobita K., Ueda M. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase, *Virology*, **61**, 397—410.
51. Plotch S. J., Tomasz J., Krug R. M. (1978). Absence of detectable capping and methylating enzymes virions, *J. Virol.*, **28**, 75—83.
52. Plotch S. J., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R. M. (1981). A unique cap(m⁷GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription, *Cell*, **23**, 847—858.
53. Portner A. (1981). The HN glycoprotein of Sendai virus: Analysis of site(s) involved in hemagglutinating and neuraminidase activities, *Virology*, **115**, 375—384.
54. Portner A., Webster R. G., Bean W. J. (1980). Similar frequencies of antigenic variants in Sendai, vesicular stomatitis and influenza A viruses, *Virology*, **104**, 235—238.
55. Re G. G., Gupta K. C., Kingsbury D. W. (1983). Genomic and copy-back 3' termini in Sendai virus defective interfering RNA species, *J. Virol.*, **45**, 659—664.
56. Re G. G., Gupta K. C., Kingsbury D. W. (1983). Sequence of the 5' end of the Sendai virus genome and its variable representation in complementary form at the 3' ends of copy-back defective interfering RNA species: Identification of the L gene terminus, *Virology*, **130**, 390—396.
57. Richardson C. D., Scheid A., Choppin P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides, *Virology*, **105**, 205—222.
58. Rohde W., Scholtissek C. (1980). On the origin of the gene coding for an influenza A virus nucleocapsid protein, *Arch. Virol.*, **64**, 213—223.
59. Rott R., Saber S., Scholtissek C. (1965). Effect on myxovirus of mitomycin C, actinomycin D and pretreatment of the host cell with ultraviolet light, *Nature (Lond.)*, **205**, 1187—1190.
60. Schaffer F. L., Hackett A. J., Soergel M. E. (1968). Vesicular stomatitis virus RNA: Complementarity between infected cell RNA and RNAs from infectious and autointerfering viral fractions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 685—692.
61. Scheid A., Graves M. C., Silver S. M., Choppin P. W. (1978). Studies of the structure and functions of paramyxovirus glycoproteins. In: *Negative Strand Viruses and the Host Cell*, ed. by B. W. J. Mahy and R. D. Barry, pp. 181—193, Academic Press, London.
62. Shekel J. J., Bayley P. M., Brown E. B., Martin S. R., Waterfield M. D., White J. M., Wilson I. A., Wiley D. C. (1982). Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 968—972.
63. Smith G. L., Hay A. J. (1982). Replication of the influenza virus genome, *Virology*, **118**, 96—108.
64. Sveda M. M., Markoff L. J., Lai C.-J. (1982). Cell surface expression of the influenza virus hemagglutinin requires the hydrophobic carboxy-terminal sequences, *Cell*, **30**, 649—656.

65. *Takanami Y., Fraenkel-Conrat H.* (1982). Comparative studies on ribonucleic acid dependent RNA polymerases in cucumber mosaic virus infected cucumber and tobacco and uninfected tobacco plants, *Biochemistry*, **21**, 3161—3167.
66. *Traver M. I., Northrop R. L., Walker D. L.* (1960). Site of intracellular antigen production by myxoviruses, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 268—273.
67. *Ulmanen I., Broni B. A., Krug R. M.* (1981). The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m⁷GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7355—7359.
68. *Ulmanen I., Broni B. A., Krug R. M.* (1983). Influenza virus temperature-sensitive cap(m⁷GpppNm)-dependent endonuclease, *J. Virol.*, **45**, 27—35.
69. *Varghese J. N., Laver W. G., Colman P. M.* (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution, *Nature (Lond.)*, **303**, 35—40.
70. *von Magnus P.* (1951). Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryo, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, **28**, 278—293.
71. *Waterson A. P.* (1962). Two kinds of myxovirus, *Nature (Lond.)*, **193**, 1163—1164.
72. *Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C.* (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature (Lond.)*, **289**, 366—373.

Список сокращений

АЗКЦ	антителозависимая клеточная цитотоксичность
АСР	активность, стимулирующая размножение
В/в	внутривенно
В/м	внутримышечно
ИЛ-1, ИЛ-2	интерлейкин 1, интерлейкин 2
ИПФР	инсулиноподобные факторы роста
КД	круговой дихризм
ЛПК	лимфоциты периферической крови
П	пропердин
ПСРЭ или SSPE	подострый склерозирующий панэнцефалит
ТФР	трансформирующие факторы роста
ФАМ	фактор активации макрофагов
ФКЭ	фибробласты куриных эмбрионов
ФРТ	фактор роста тромбоцитов
ФТМ	фактор торможения миграции макрофагов
ЭФР	эпидермальный фактор роста
AAV	аденоассоциированные вирусы
AEV	вирус эритробластога птиц
ALV	вирус лейкоза птиц
BEV	эндогенный вирус павианов
BLV	вирус лейкоза крупного рогатого скота
BPV	вирус папилломы крупного рогатого скота
CPV	вирус хронического паралича (пчел)
CPVA	вирус-сателлит вируса хронического паралича (пчел)
CRPV	вирус папилломы кроликов
DH (ГЗТ)	гиперчувствительность замедленного типа
DHBV	вирус гепатита В уток
EBNA	ядерный антиген вируса Эпштейна — Барр
EHV	вирус герпеса лошадей

FeLV	вирус лейкоза кошек
FeSV	вирус саркомы кошек
FMDV	вирус ящура
GALV	вирус лейкоза гиббонов
GSHV	вирус гепатита В земляных белок
HAV	вирус гепатита А
HBV	вирус гепатита В
HCMV	цитомегаловирус человека
HPV	вирус папилломы человека
HSV	вирус простого герпеса
HTLV	вирус Т-клеточного лейкоза человека
KiSV	вирус саркомы Кирстена
LAC	вирус Ла Кросс
LCMV	вирус лимфоцитарного хориоменингита
MDV	вирус болезни Марека
MMTV	вирус опухоли молочных желез мышей
MPMV	вирус обезьян Мезон — Пфайзера
MuLV	вирус лейкоза мышей
MuSV	вирус саркомы мышей
NDV	вирус ньюкаслской болезни
NK	естественные киллеры
REV	вирус ретикулоэндотелиоза птиц
RS	респираторно-синцитиальный вирус
RSV	вирус саркомы Рауса
RVF	вирус лихорадки Долины Рифт
SBMV	вирус южной мозаики бобов
SFFV	вирус Френд, вызывающий образование фокусов в селезенке
SFV	вирус леса Семлики
SIN	вирус Синдбис
SSH	вирус зайца-беляка
SSV	вирус саркомы обезьян
STNV	вирус-сателлит вируса некроза табака
SV40	обезьяний вирус 40
TBSV	вирус кустистой карликовости томатов
Tc	цитотоксические Т-клетки
Td	Т-клетки, вызывающие гиперчувствительность замедленного типа
TMV	вирус табачной мозаики
Ts	супрессорные Т-клетки
VSV	вирус везикулярного стоматита
VZV	вирус ветрянки/опоясывающего лишая
WHV	вирус гепатита В североамериканского лесного сурка

Глава 14. Ответ хозяина на вирусную инфекцию. Дж. Г. П. Сиссонс, М. Б. А. Олдстоун	5
Индукция специфического иммунного ответа на вирусы	6
Гены главного комплекса гистосовместимости	7
Вирусы как антигены	9
Презентация антигена	10
Индукция Т-клеточного ответа	11
Формирование В-клеточного ответа и антител	17
Идиотипы и теория сети	18
Клеточные эффекторные механизмы	19
Естественные киллеры	19
Антителозависимая клеточная цитотоксичность	21
Гиперчувствительность замедленного типа	21
Вирус-специфические цитотоксические Т-лимфоциты	23
Гуморальные эффекторные механизмы	25
Нейтрализация вируса антителами	25
Роль комплемента	26
Лизис зараженных вирусом клеток антителами и комплементом	28
Значение механизмов резистентности хозяина <i>in vivo</i>	29
Последствия иммунодефицита	29
Иммунопатология вирусных инфекций	30
Литература	32
 Глава 15. Интерфероны. В. К. Йоклик	 35
Природа интерферонов	39
Природа генов интерферонов	42
Продуцирование интерферонов	47
Линии клеток, спонтанно продуцирующие интерферон	47
Антигены, индуцирующие интерферон	47
Праймирование	53
Интерфероновые мРНК	53
Очистка	54
Различные биологические эффекты интерферонов	55
Интерфероновые рецепторы	55
Антивирусная активность интерферонов	56
Влияние интерферона на размножение опухолеродных вирусов и трансформацию клеток	64
Антипролиферативная активность интерферонов	66
Ингибирующее действие интерферонов на размножение клеток	67
Подавление размножения клеток	68
Усиление и подавление синтеза индивидуальных белков	68

Гормональная концепция действия интерферона	70
Влияние интерферона на структурные компоненты клетки	70
Влияние интерферона на дифференцировку	71
Влияние интерферона на иммунную систему	71
Исследование клеточных линий, устойчивых к интерферону	71
Перспективы клинического использования	72
Литература	74

Глава 16. Противовирусная химиотерапия. Сунвен Чу, Томас Мериган	89
Доклиническая оценка противовирусных препаратов . . .	89
Механизмы противовирусного действия	89
Определение противовирусной активности <i>in vitro</i>	90
Модели для испытания противовирусных препаратов на животных	91
Факторы, влияющие на естественное развитие вирусных инфекций	91
Вирус	91
Хозяин	92
Клиническая противовирусная терапия	92
Специфическая диагностика	92
Предположительный эффект и риск	93
Имеющиеся в настоящее время разрешенные противовирусные препараты	95
Видарабин (аденинарабинозид)	96
Противовирусная активность <i>in vitro</i>	96
Противовирусная активность <i>in vivo</i>	96
Доклиническая токсикология	97
Клиническая фармакология	97
Клинические испытания	98
Ацикловир	104
Противовирусная активность <i>in vitro</i>	105
Активность <i>in vivo</i> на животных	105
Токсичность	106
Клиническая фармакология	106
Клинические испытания	107
Другие аналоги нуклеозидов	113
Идоксуридин	113
Цитарабин	114
Трифлюридин	114
Бромвинилдезоксуридин	114
Рибавирин	115
Интерфероны (см. гл. 15)	115
Номенклатура и характеристика	116
Биологическая активность интерферона	117
Производство интерферона для клинического применения	119
Противовирусная активность <i>in vitro</i>	120
Противовирусная активность <i>in vivo</i>	121
Клиническая фармакология	121
Клинический опыт использования экзогенного интерферона в качестве противовирусного агента	123
Индукторы интерферона	127
Амантадин и римантадин	127
Противовирусная активность <i>in vitro</i>	128
Противовирусная активность <i>in vivo</i>	128

Токсичность	128
Клиническая фармакология	128
Клиническое изучение	129
Показания для клинического применения	130
Другие противовирусные вещества	130
Аридон	130
Фосфоноуксусная и фосфономуравьиная кислоты	130
Метисазон	131
Заключение	131
Литература	132

Глава 17. Противовирусная иммунизация. *Брайан Мэрфи, Роберт Ченок* 145

Иммунитет к вирусным инфекциям	145
Антигены, участвующие в формировании иммунитета	145
Иммунные механизмы, уничтожающие вирус или зараженные им клетки	147
Системный иммунитет и иммунитет, опосредованный слизистой оболочкой	149
Имеющиеся в настоящее время разрешенные вакцины	150
Имеющиеся в обращении разрешенные инактивированные вакцины	151
Потенциальные источники антигенов для будущих инактивированных вакцин	152
Преимущества инактивированных вакцин	157
Недостатки инактивированных вакцин	161
Живые вирусные вакцины	161
Живые вирусные вакцины, применяемые в настоящее время	161
Основы аттенуации	163
Преимущества живых вирусных вакцин	166
Недостатки живых вирусных вакцин	166
Направления усовершенствования живых аттенуированных вакцин в будущем	168
Миссенс-мутации	169
Реассортация генов	172
Создание стабильных мутантов с помощью технологии рекомбинантной ДНК	174
Литература	178

Глава 18. Пикорнавирусы и их репликация. *Рональд Р. Рюкерт* 190

Классификация	191
Роды	191
Устойчивость к рН	193
Геномная РНК и ее продукты	194
Чувствительность к рибонуклеазе	194
Структура РНК пикорнавирусов	194
Poly (A)	195
VPg-РНК	195
Участок poly (C)	196
Белок-кодирующая область	197

Генетическая рекомбинация	198
Вирион	199
Физические свойства	199
Белковая оболочка	200
Капсомеры	201
Протомер	201
Додекаэдрическая природа белковой оболочки	203
Плавающая плотность пикорнавирусов	205
Масса вирионов пикорнавирусов	206
Соотношение числа частиц и инфекционных единиц	206
Структура протомера	208
Функции протомера	208
Расположение четырех сегментов	208
Серотип	209
Локализация антигенных участков	209
Нейтрализация	209
Локализация связывающих доменов	210
Перспективные направления	210
Цикл размножения	211
Адсорбция вируса на клеточной поверхности, проникнове- ние в клетку и разделение	214
Измерение скорости адсорбции	214
Электростатическая природа этапа присоединения вируса	216
Детерминанты сродства вирусов к определенным клеткам	216
Семейства рецепторов	218
Природа рецепторов	219
Антирецепторы	220
Проникновение вируса в клетку и разделение	220
Воздействие на клетку-хозяина	222
Роль клетки-хозяина	222
Цитопатические эффекты	225
Подавление синтеза клеточной РНК	225
Подавление синтеза белков клетки-хозяина	226
Другие события	227
Нейровирулентность	228
Синтез вирусных РНК и белков	229
Первый этап	229
Синтез РНК	229
Роль мембран в синтезе РНК	230
Кинетика синтеза вирусной РНК	231
Роль VPg в регуляции инфекционного цикла	231
Синтез и расщепление полипротеина	231
Морфогенез	233
Природные пустые капсиды	235
Антигенная трансформация N—H	236
S-антиген	237
Сборка ППК из 14S-субъединиц in vitro	237
Морфопоэтический фактор	237
Роль гладкого эндоплазматического ретикулула	238
Образование вирионов и расщепление, приводящее к со- зреванию	238
Структура 5S- и 14S-субъединиц	239
Механизм упаковки РНК	239
Три типа ППК	240
Заключение	240
Литература	241

Глава 19. Реовирусы. Кеннет Л. Тайлер, Бернард Н. Филдс 257

Исторические аспекты	257
Структура	258
Физико-химические свойства	259
Геном	259
Репликация	260
Круг хозяев и патогенность	262
Литература	262

Глава 20. Репликация реовирусов. Кеннет Л. Тайлер, Бернард Н. Филдс 265

История вопроса	265
Вирусы	267
Классификация	267
Морфология	269
Физико-химические свойства	271
Химические свойства вирионных РНК и белков	272
Определение концентрации вируса и очистка	282
Репликация	284
Адсорбция	284
Проникновение вируса в клетку	285
Разделение	286
Транскрипция	286
Трансляция	289
Сборка и освобождение вирионов	290
Изменения, вызываемые вирусом в зараженных клетках	291
Патогенез	294
Заражение хозяина	295
Распространение по организму	297
Клеточная и тканевая тропность	299
Иммунный ответ организма-хозяина	303
Повреждения клеток	308
Персистентная инфекция	308
Реовирусы и заболевания человека и животных	310
Заболевания человека	311
Заболевания животных	311
Диагностика реовирусной инфекции	318
Молекулярная эпидемиология	320
Генетика реовирусов	320
Типы мутантов	321
Реассортация геномов реовирусов	324
Биологические исследования с реассортантами	325
Литература	326

Глава 21. Репликация тогавирусов. Милтон Дж. Шлезингер 343

Структура генома	344
Начало цикла репликации — адсорбция	344
Проникновение вируса и разделение	346
Репликация вирусного генома	347
Синтез структурных белков вируса: трансляция субгеномной РНК	353
Созревание и транспорт вирусных гликопротеинов	355
Сборка и почкование вируса	357

Репликация флавириусов	359
Взаимодействие вируса с клеткой хозяина	359
Литература	360
Глава 22. Репликация аренавириусов и буньявириусов.	
<i>Дэвид Бишоп</i>	366
Семейство Bunyaviridae	366
Род <i>Bunyavirus</i>	371
Стадии репликации буньявириусов	373
Генетические свойства буньявириусов	378
Род <i>Phlebovirus</i>	384
Стадии репликации флебовириусов	386
Род <i>Nairovirus</i>	387
Род <i>Uukuvirus</i>	389
Неклассифицированные вирусы: вирус Хантаан	391
Arenaviridae	392
Генетические свойства аренавириусов	399
Процесс репликации аренавириусов	401
Персистентная инфекция	402
Заражение аренавирусами in vivo	402
Литература	403
Глава 23. Рабдовирусы. Сьюзен У. Эмерсон	418
Прикрепление, проникновение и раздевание вируса	422
Синтез РНК	425
Синтез и созревание вирусных белков	434
Сборка вирионов	438
Влияние на метаболизм клетки-хозяина	439
Вирусная персистенция	441
Глава 24. Орто- и парамиксовирусы и их репликация.	
<i>Д. У. Кингсбери</i>	446
Сравнительный обзор двух семейств миксовириусов	447
Морфология	448
Организация генома и вирусные белки	451
Репликация ортомиксовириусов	455
Присоединение вируса к клеточной поверхности и проникновение в клетку	455
Транскрипция и трансляция	458
Репликация РНК	466
Генетические взаимодействия	467
Сборка и высвобождение вирионов	470
Репликация парамиксовириусов	473
Присоединение вируса к клеточной поверхности и проникновение его в клетку	473
Транскрипция и трансляция	475
Репликация РНК	477
Генетические взаимодействия	478
Сборка и высвобождение вирионов	480
Заключение	481
Литература	482
Список сокращений	487

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва

1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Учебное издание

Сиссонс Дж. Г. П., Олдстоун Майкл Б. А., Йоклик Б. К. и др.
ВИРУСОЛОГИЯ

под редакцией
Бернарда Филдса, Дэвида Найпа
при участии Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа

В 3-х томах
Том 2

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР Т. М. Турпаев
Зам. зав. редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Ст. научн. редактор Н. Н. Шафрановская
Научн. редактор Т. И. Пономарева
Мл. редактор И. А. Деменцова
Художник В. Е. Карпов
Художественные редакторы А. М. Аленичева, А. Я. Мусин
Технический редактор О. Г. Лапко
Корректор С. С. Суставова

ИБ № 6731

Слано в набор 26.12.88. Подписано к печати 6.06.89. Формат 60×90¹/₈. Бумага книжно-журнальная. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 15,50 бум. л. Усл. печ. л. 31,00. Усл. кр.-отт. 31,00. Уч.-изд. л. 35,72. Изд. № 4/5841. Тираж 12 800 экз. Зак. № 751. Цена 3 р. 20 к.

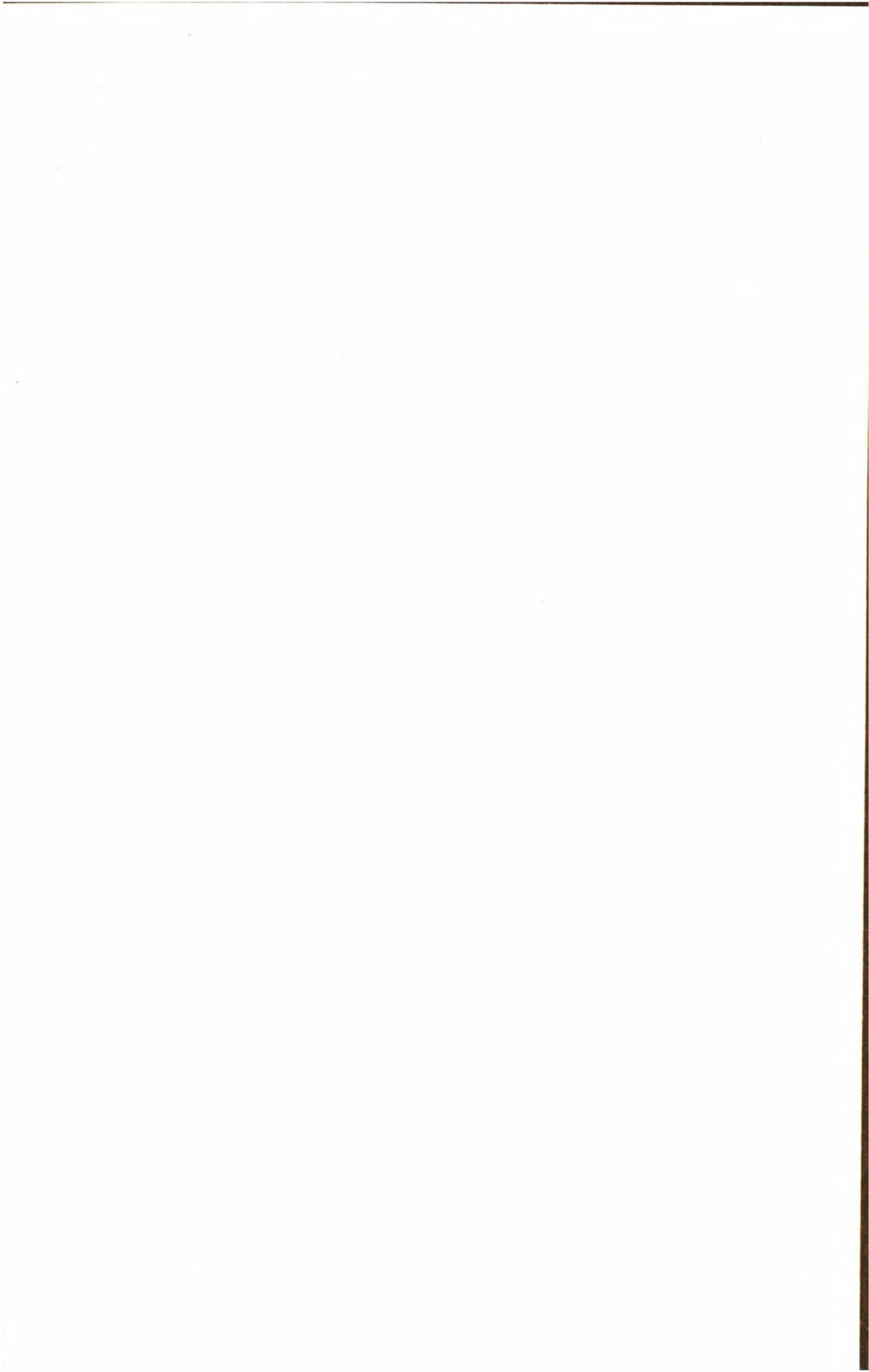
Издательство «МИР» В/О «Совэкспорткнига» Государственного комитета СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 129829, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва, Нагатинская ул., 1.

НО-
СЛ.
КЗ.

по
110,

СР
ИН.



2

BRAND
JOHN
BURN

